COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test	CMVCAP	72 Tests	P/N: 04902068 190
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent	PG WR	5.1 Liters	P/N: 03587797 190

USAGE PRÉVU

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV est un test in vitro d'amplification de l'acide nucléique pour le dosage quantitatif de l'ADN du cytomégalovirus dans le plasma humain EDTA au moyen de l'appareil COBAS® AmpliPrep pour le traitement automatisé des échantillons et de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 pour l'amplification et la détection automatisées. Le test peut quantifier de 150 à 10 000 000 de copies/mL d'ADN du CMV. Une copie d'ADN du CMV (tel que défini par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV) équivaut à 0,91 unités internationales (UI) [1,1 cp/UI] tel que défini dans la première norme internationale de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques pour le cytomégalovirus humain (NIBSC 09/162).[1]

Le test est destiné à être utilisé en complément du tableau clinique et d'autres marqueurs biologiques pour le traitement de l'infection par le CMV chez les patients présentant un risque de maladie à CMV.

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV ne doit servir ni de test de dépistage du CMV dans le sang ou les produits sanguins, ni de test diagnostique pour confirmer la présence d'une infection par le CMV. Les résultats du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV doivent être interprétés en tenant compte de tous les résultats cliniques et de laboratoire pertinents.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Le cytomégalovirus humain (HCMV ou CMV) est un agent pathogène viral humain appartenant à la famille Herpèsvirus, rencontré à la fois dans les sociétés industrielles développées et dans les groupes autochtones isolés.[2,3] Il peut être transmis par le sang, les sécrétions oropharyngées, l'urine, les excrétions cervicales et vaginales, le liquide spermatique, le lait maternel, les larmes et les selles.[4-10] Les primo-infections par le CMV chez des personnes immunocompétentes sont généralement asymptomatiques et entraînent souvent des infections latentes non détectées. Les cellules mononucléaires du sang périphérique et les cellules endothéliales semblent constituer les principaux sites d'infection. Le CMV reste au stade latent dans les monocytes/macrophages chez les humains.[3] Les liquides organiques des individus présentant une infection latente peuvent contenir le virus, ce qui présente un risque de contamination pour d'autres. Les personnes immunodéprimées, y compris les nouveau-nés, les patients greffés et les patients ayant le sida présentent un risque élevé de développer des infections par le CMV graves, pouvant conduire à un taux élevé de morbidité et de mortalité.[11] Les manifestations cliniques sévères de la maladie à CMV comprennent le syndrome de CMV, la rétinite, la gastroentérite, l'hépatite, l'encéphalite, l'œsophagite, l'entérocolite, la pancréatite et la pneumonie.[2-14]

Les méthodes de laboratoire pour le diagnostic d'une infection disséminée et d'une maladie active d'un organe cible dues au cytomégalovirus humain comprennent l'isolation du virus par culture à partir des leucocytes du sang périphérique, l'histologie des biopsies, des méthodes sérologiques, la mesure de l'antigène pp65 et la détection de l'ADN du CMV par des méthodes de PCR (polymerase chain reaction - réaction en chaîne de la polymérase).[15] Les méthodes de culture cellulaire présentent une faible valeur prédictive, nécessitent un délai d'exécution compris entre 48 heures et 3 semaines et sont d'une utilisation limitée, en particulier chez les patients immunodéprimés. Le test de l'antigénémie du gène pp65 demande beaucoup de travail et nécessite un traitement du sang dans les six heures suivant le prélèvement en raison de la diminution de l'antigénémie pendant la conservation.[16,23] Le dosage du gène pp65 est également difficile à effectuer sur des patients présentant une neutropénie grave.

Le développement de la détection directe de l'ADN du CMV dans le plasma à l'aide de la PCR s'est avéré présenter une bonne corrélation avec la positivité en culture des PBL (peripheral blood leukocytes - leucocytes du sang périphérique) et l'augmentation du risque de développement d'une maladie à CMV systémique. Plusieurs études ont montré l'association entre la charge virale du CMV et le risque d'apparition d'une maladie à CMV.[17-20]

Le risque de maladie à CMV est clairement défini par une charge virale élevée, ce qui souligne le rôle important du titre viral dans la pathogenèse de la maladie.[19,28,31,32] Des études réalisées sur des receveurs de greffe et des patients sidéens ont montré que la détection par PCR de l'ADN du CMV est hautement prédictive de l'apparition ultérieure et de l'issue clinique de la maladie.[18,24-27] Des évaluations quantitatives des taux d'ADN du CMV ont montré qu'une charge virale élevée, ainsi qu'une augmentation de la charge virale dans le temps sont en corrélation avec un pronostic clinique plus sombre pour plusieurs états à risque de CMV.[19,28,29] En outre, le dosage quantitatif par PCR permet le suivi de l'efficacité du traitement antiviral et une évaluation indirecte de la résistance virale.[27,30,31,33]

L'utilisation de la charge virale du CMV est recommandée dans les directives actuelles de traitement dans le cas de greffe d'organe solide afin de surveiller le risque d'apparition d'une maladie à CMV chez les patients et le besoin d'un traitement préalable, ainsi que pour le suivi de la réponse au traitement chez les patients présentant une maladie à CMV active.[22,23] Elle est également recommandée comme critère diagnostique pour la détection de la maladie à CMV chez les receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques.[34]

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV est un test d'amplification de l'acide nucléique pour la quantification de l'ADN du cytomégalovirus (CMV) dans le plasma humain. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV repose sur deux principaux processus : (1) la préparation des échantillons dans le but d'isoler l'ADN du CMV et (2) l'amplification par PCR de l'ADN cible en même temps que la détection de la sonde de détection d'oligonucléotides clivés, doublement marqués, spécifique de la cible.

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV permet la préparation automatique des échantillons, suivie de l'amplification par PCR et de la détection de l'ADN cible du CMV et de l'ADN du standard de quantification (QS) du CMV. Le mélange réactionnel contient des amorces et des sondes spécifiques à la fois de l'ADN du CMV et de celui de l'ADN du QS du CMV. La détection de l'ADN amplifié est réalisée par l'utilisation de sondes oligonucléotidiques doublement marquées spécifiques de la cible et du QS, permettant l'identification indépendante des amplicons du CMV et du QS du CMV.

La quantification de l'ADN viral du CMV est réalisée à l'aide du QS du CMV. Il compense les effets d'inhibition et contrôle les processus de préparation et d'amplification, permettant une mesure quantitative plus exacte de l'ADN du CMV présent dans chaque échantillon. Le QS du CMV est une construction d'ADN non infectieuse qui contient des sites de liaison aux amorces identiques à ceux de l'ADN cible du CMV, et un site unique de liaison à la sonde qui permet de distinguer l'amplicon du QS du CMV de l'amplicon cible du CMV.

Le QS du CMV est incorporé en un nombre connu de copies à tous les échantillons. Il subit ainsi toutes les étapes de traitement des échantillons : préparation, amplification par PCR et détection simultanée des sondes de détection d'oligonucléotides clivés doublement marqués. L'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 calcule la concentration d'ADN du CMV dans les échantillons de test par comparaison du signal CMV au signal du QS du CMV pour chaque échantillon et chaque témoin.

Sélection des cibles

La préparation des échantillons génériques à base de silice est utilisée pour capturer l'ADN du CMV et l'ADN du QS du CMV, et les oligonucléotides définis servent d'amorces dans l'amplification de l'ADN du CMV et de l'ADN du QS du CMV. Une sonde spécifique des cibles et une sonde oligonucléotidique doublement marquée spécifique du QS permettent l'identification indépendante de l'amplicon du CMV et de celui du QS du CMV. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV utilise deux sondes d'amplification pour la PCR. Une sonde doublement marquée émettrice de signal s'hybride à l'un des deux brins et est clivée par l'ADN Z05 polymérase pendant l'extension des amorces.

Préparation des échantillons

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV recourt à la préparation automatisée des échantillons sur l'appareil COBAS® AmpliPrep à l'aide d'une technique générique de capture à base de silice. La procédure nécessite un échantillon de plasma EDTA d'un volume de 500 µL, dont 350 µL sont traités par l'appareil COBAS® AmpliPrep. Les particules du virus du CMV sont lysées par incubation à des températures élevées à l'aide d'un tampon de liaison/lyse chaotrope et protéatique qui libère des acides nucléiques et protège l'ADN du CMV libéré contre les DNases du plasma. La protéase et une quantité connue de molécules d'ADN du QS du CMV sont introduites dans chaque échantillon avec le réactif de lyse et des particules de verre magnétiques. Ensuite, le mélange est incubé et l'ADN du CMV et l'ADN du QS du CMV sont liés à la surface des particules de verre magnétiques. Les substances non liées, comme les sels, les protéines et d'autres impuretés cellulaires, sont retirées par lavage des particules de verre magnétiques. Une fois les particules de verre magnétiques séparées et les étapes de lavage terminées, les acides nucléiques absorbés sont élués à température élevée avec une solution aqueuse. L'échantillon traité, contenant l'ADN du CMV et l'ADN du QS du CMV libérés, est ajouté au mélange d'amplification et transféré sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48.

Amplification par PCR

La réaction d'amplification par PCR est effectuée avec l'ADN polymérase de l'enzyme recombinante thermostable Thermus specie Z05 (Z05). En présence de magnésium (Mg^{2+}) et dans des conditions tampon appropriées, Z05 exerce une activité d'ADN polymérase[35]. Cela permet l'amplification par PCR et la détection en temps réel de l'amplicon.

Les échantillons traités sont ajoutés au mélange d'amplification dans les tubes pour amplification (tubes K) dans lesquels se déroulera la PCR. En présence de Mg^{2+} et d'un excès de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) comprenant les triphosphates de désoxyadénosine, de désoxyguanosine, de désoxycytidine, de désoxyuridine et de désoxythymidine, la polymérase Z05 allonge les amorces hybridées, produisant ainsi des brins d'ADN.

Amplification des cibles

Le thermocycleur de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 chauffe le mélange réactionnel afin de dénaturer l'ADN bicaténaire et d'exposer les séquences cibles des amorces spécifiques. À mesure que le mélange refroidit, les amorces s'hybrident avec l'ADN cible. L'ADN polymérase Z05, en présence de Mg^{2+} et d'un excès de désoxynucléotides triphosphates (dNTP), permet l'extension des amorces hybridées le long du modèle cible, pour produire des molécules d'ADN bicaténaire appelées « amplicon ». L'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 répète automatiquement cette opération pendant un nombre de cycles déterminé, chaque cycle doublant la quantité d'ADN d'amplicon. Le nombre de cycles nécessaires est préprogrammé dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48. L'amplification n'a lieu que dans la région du génome du CMV située entre les amorces. Le génome du CMV n'est pas entièrement amplifié.

Amplification sélective

L'amplification sélective de l'acide nucléique cible à partir de l'échantillon est réalisée grâce au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV à l'aide de l'enzyme AmpErase (uracil-N-glycosylase) et du triphosphate de désoxyuridine (dUTP). L'enzyme AmpErase reconnaît et catalyse la destruction des brins d'ADN contenant de la désoxyuridine[36], mais pas de l'ADN contenant de la désoxythymidine. L'ADN naturel ne contient pas de désoxyuridine, mais les amplicons en contiennent toujours du fait de l'utilisation de désoxyuridine triphosphate en tant que l'un des dNTP du mélange réactionnel; ainsi, seuls les amplicons renferment de la désoxyuridine. La désoxyuridine rend les amplicons contaminants susceptibles d'être détruits par l'enzyme AmpErase avant l'amplification de l'ADN cible. De même, tout produit non spécifique formé après l'activation initiale du mélange réactionnel par magnésium est détruit par l'enzyme AmpErase. L'enzyme AmpErase, contenue dans le mélange réactionnel, catalyse le clivage de l'ADN contenant de la désoxyuridine au niveau des résidus de désoxyuridine, en ouvrant la chaîne de désoxyribose en position C1. Lorsqu'elle est chauffée au cours de la première étape du thermocyclage, la chaîne d'ADN de l'amplicon se scinde à la position de la désoxyuridine, rendant ainsi l'ADN non amplifiable. L'enzyme AmpErase reste inactive pendant une période prolongée une fois qu'elle est exposée à des températures supérieures à 55 °C, c'est-à-dire pendant les étapes de thermocyclage, et ne détruit donc pas l'amplicon cible formé pendant l'amplification.

Détection des produits de PCR au cours d'un test COBAS® TaqMan®

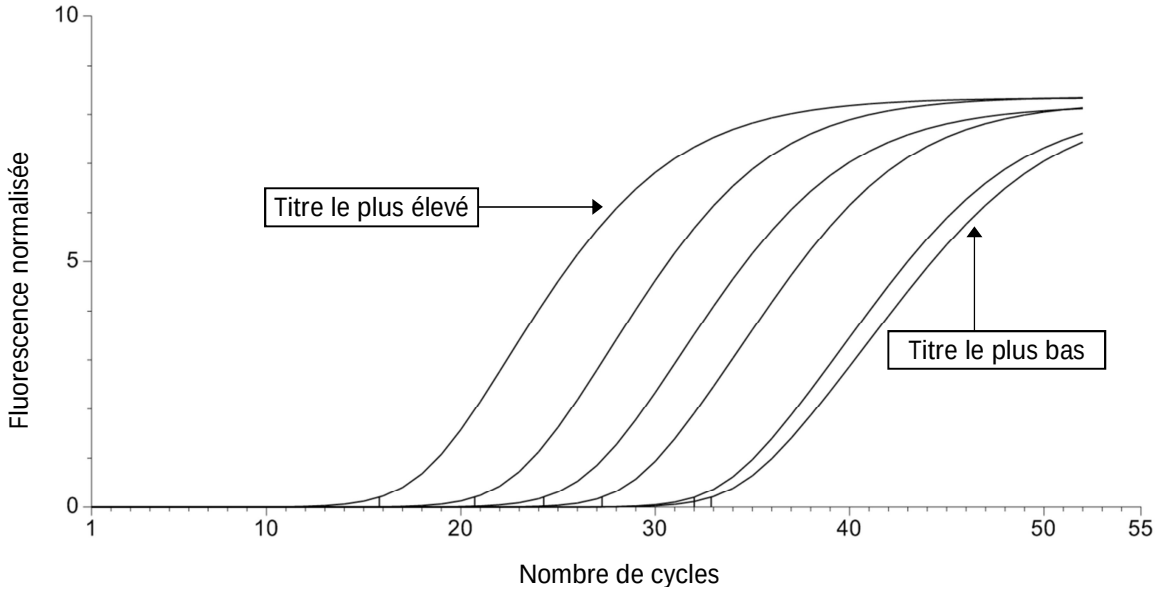
Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV utilise la technologie d'amplification par PCR en temps réel[37,38]. L'utilisation de sondes fluorescentes doublement marquées permet une détection en temps réel de l'accumulation des produits de la PCR par contrôle de l'intensité d'émission des fluorophores rapporteurs libérés pendant la procédure d'amplification. Les sondes sont des sondes oligonucléotidiques spécifiques au CMV et au QS du CMV avec un fluorophore rapporteur et un fluorophore quencher. Au cours du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV, les sondes de CMV et de QS du CMV sont marquées avec des fluorophores rapporteurs différents. Lorsque ces sondes sont intactes, la fluorescence du fluorophore rapporteur est supprimée du fait de la proximité du fluorophore quencher par suite des effets de transfert d'énergie de type Förster. Pendant la PCR, la sonde s'hybride à la séquence cible et est clivée par l'activité nucléase 5' → 3' de l'ADN polymérase thermostable Z05. Quand le fluorophore rapporteur et le fluorophore quencher sont libérés et séparés, la neutralisation s'arrête et l'activité fluorescente du fluorophore rapporteur est augmentée. L'amplification de l'ADN du CMV et celle de l'ADN du QS du CMV sont mesurées indépendamment à des longueurs d'ondes différentes. Ce processus est répété pour un nombre déterminé de cycles, chaque cycle augmentant efficacement l'intensité d'émission des fluorophores rapporteurs individuels, ce qui permet une identification indépendante de l'ADN du CMV et de l'ADN du QS du CMV. Là où une courbe de croissance débute une croissance exponentielle, le cycle PCR est lié à la quantité de produit de départ au début de la PCR.

Règles de base de la quantification avec le test COBAS® TaqMan®

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV est quantitatif sur un domaine de linéarité très large, car le contrôle de l'amplicon est effectué pendant la phase exponentielle de l'amplification. Plus le titre du CMV d'un échantillon est élevé, plus la fluorescence du fluorophore rapporteur des sondes de CMV dépassera rapidement le niveau de fluorescence de base (voir Figure 1). Puisque la quantité d'ADN du QS du CMV est constante entre tous les échantillons, la fluorescence du fluorophore rapporteur de la sonde du QS du CMV doit apparaître à un cycle similaire pour tous les échantillons (voir Figure 2). La concentration est ajustée en conséquence dans les échantillons où la fluorescence du QS est affectée. L'apparition des signaux spécifiques de fluorescence est considérée comme une valeur de seuil critique (Ct). La valeur Ct est définie comme le nombre de cycles fractionnels où la fluorescence du fluorophore rapporteur dépasse un seuil prédéterminé (le niveau de fluorescence théorique) et commence la phase de croissance exponentielle de ce signal (voir Figure 3). Une valeur de Ct plus grande indique un titre plus faible du produit cible CMV d'origine. Une multiplication par 2 du titre correspond à une baisse d'une Ct de l'ADN du CMV cible, tandis qu'une multiplication par 10 correspond à une baisse de 3,3 Ct.

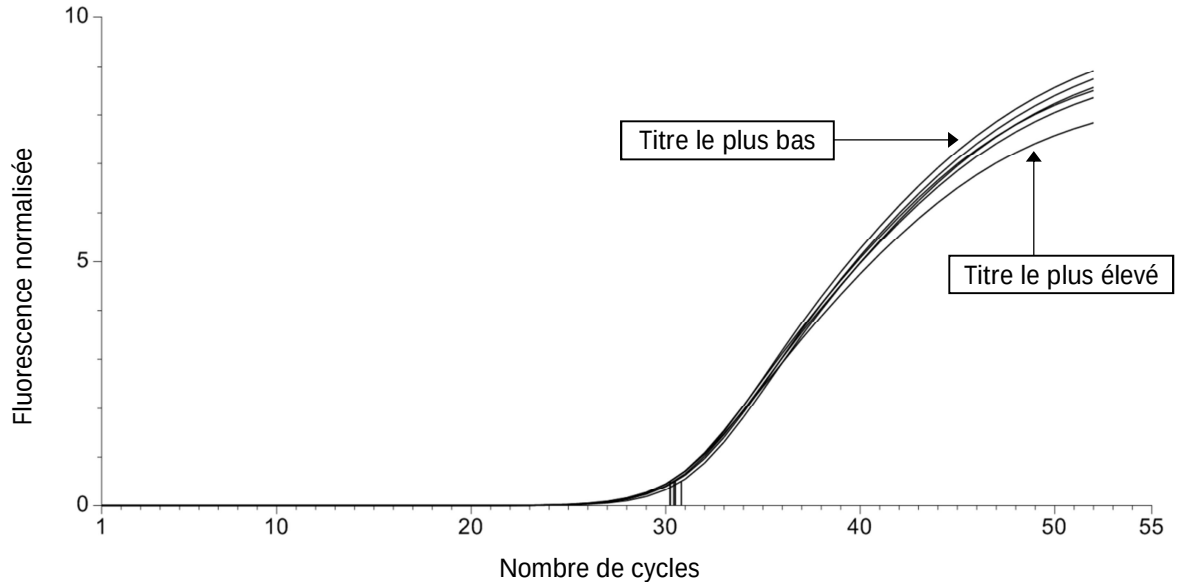
La figure 1 montre des exemples de courbes de croissance cibles pour une série de dilutions effectuées sur une plage de 5-$\log_{10}$. À mesure que la concentration du virus augmente, les courbes de croissance se déplacent vers des cycles précédents. Par conséquent, la courbe de croissance la plus à gauche correspond au titre viral le plus élevé alors que la courbe de croissance la plus à droite représente le titre viral le plus faible.

Figure 1
Courbes de croissance cibles pour une série de dilutions du virus effectuées sur une plage de 5-$\log_{10}$



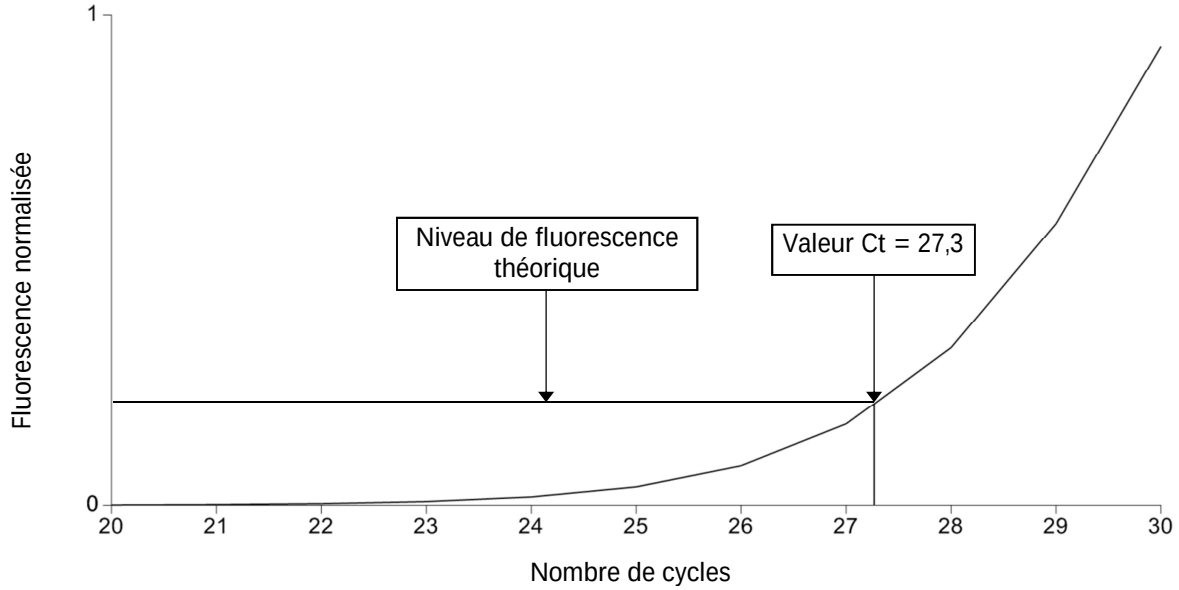
La figure 2 montre des exemples de courbes de croissance du standard de quantification pour les échantillons d'une série de dilutions virales effectuées sur une plage de 5-$\log_{10}$. Le volume de standard de quantification ajouté à chaque échantillon est constant pour chaque réaction. La valeur de Ct du standard de quantification est la même, quelle que soit la concentration virale.

Figure 2
Courbes de croissance du standard de quantification pour une série de dilutions du virus effectuées sur une plage de 5-$\log_{10}$



La figure 3 présente un exemple de normalisation des valeurs de fluorescence à chaque cycle pour chaque courbe de croissance. Le nombre de cycles fractionnels (valeur Ct) est calculé au point de rencontre du signal de fluorescence et du niveau de fluorescence théorique.

Figure 3
Les valeurs de fluorescence de chaque cycle sont normalisées pour chaque courbe de croissance



Quantification de l'ADN du CMV

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV détermine la charge virale de l'ADN du CMV en utilisant une seconde séquence cible (celle du standard de quantification du CMV), qui est ajoutée, à une concentration connue, à chaque échantillon à analyser. Le QS du CMV est une construction d'ADN non infectieuse, contenant des fragments de séquences du CMV qui présentent des sites de liaison aux amorces identiques à ceux de la séquence cible du CMV. Le QS du CMV contient des sites de liaison aux amorces du CMV et génère un produit amplifié dont la longueur et la composition de base sont identiques à celles de l'ADN cible du CMV. Le site de liaison à la sonde de détection du QS du CMV a été modifié pour permettre de distinguer l'amplicon du QS du CMV de l'amplicon cible du CMV.

Pendant la phase d'hybridation de la PCR dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, les échantillons sont éclairés et excités par une lumière filtrée, et des données de fluorescence d'émission filtrée sont recueillies pour chaque échantillon. Les mesures pour chaque échantillon sont alors corrigées pour les fluctuations instrumentales. Ces mesures de fluorescence sont envoyées par l'appareil au logiciel AMPLILINK et stockées dans une base de données.

Des vérifications préalables sont utilisées pour vérifier que les données de l'ADN du CMV et de l'ADN du QS du CMV représentent des ensembles valides et des messages sont générés lorsque les données se trouvent hors des limites préétablies. Une fois que les vérifications préalables sont effectuées avec succès, les mesures de fluorescence sont traitées dans le but de générer des valeurs de Ct de l'ADN du CMV et de l'ADN du QS du CMV. Les constantes d'étalonnage spécifiques des lots fournies avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV servent à calculer la valeur de titre des échantillons et des témoins en se basant sur les valeurs de Ct de l'ADN du CMV et de l'ADN du QS du CMV. Les résultats de titre sont donnés en unités internationales par millilitre (UI/mL) ou en copies/mL (cp/mL).

RÉACTIFS

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test — CMVCAP — 72 tests
(P/N : 04902068 190)

- CMV CS1 — 1 x 72 tests
  (Cassette de réactifs de particules de verre magnétiques)
  - Particules de verre magnétiques
  - Tampon de base Tris
  - 0,09 % d'azide de sodium
  - 0,1 % de méthylparabène
- CMV CS2 — 1 x 72 tests
  (Cassette de réactifs de lyse CMV)
  - Citrate de sodium dihydraté
  - 42,5 % de thiocyanate de guanidine
  - 3,6 % de polydocanol
  - 1,8 % de dithiothréitol
- CMV CS3 — 1 x 72 tests
  Cassette de multi-réactifs CMV contenant :
  - Pase — 1 x 3,8 mL
    (solution de protéinase)
    - Tampon Tris
    - < 0,05 % d'EDTA
    - Chlorure de calcium
    - Acétate de calcium
    - ≤ 7,8 % de protéinase
    - Glycérol
  - EB — 1 x 8,1 mL
    (Tampon d'élution)
    - Tampon de base Tris
    - Hydroxyde de sodium
    - 0,09 % d'azide de sodium

CMV CS4 — 1 x 72 tests

Cassette de réactifs spécifiques au test CMV contenant :

CMV QS — 1 x 6,2 mL

(Standard de quantification du CMV)

- Tampon Tris-HCl
- EDTA
- < 0,005 % d'ARN poly rA (synthétique)
- < 0,001 % d'ADN plasmidique non infectieux (microbien)
  contenant des séquences de liaison aux amorces de CMV
  et un site unique de liaison à la sonde
- 0,05 % d'azide de sodium

CMV MMX — 1 x 3,2 mL

(Mélange réactionnel CMV)

- Tampon tricine
- Acétate de potassium
- Hydroxyde de potassium
- < 20 % de diméthylsulfoxyde
- Glycérol
- < 0,05 % de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP
- < 0,01 % des amorces CMV d'amont et d'aval
- < 0,01 % d'aptamère oligonucléotidique
- < 0,01 % de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence
  spécifiques du CMV et du standard de quantification du CMV
- < 0,05 % d'ADN polymérase Z05 (d'origine microbienne)
- < 0,1 % d'enzyme AmpErase (uracile-N-glycosylase) (d'origine microbienne)
- 0,09 % d'azide de sodium

$MgCl_2$ — 1 x 9,8 mL

(Solution de magnésium CAP/CTM)

- < 0,6 % de chlorure de magnésium
- 0,09 % d'azide de sodium

CMV H(+)C — 6 x 0,65 mL

(Témoin fortement positif CMV)

- < 0,001 % phage lambda contenant de l'ADN du CMV
- Plasma humain, non réactif aux tests approuvés ou agréés par la FDA américaine
  pour les anticorps anti-VHC, les anticorps anti-VIH 1/2, l'antigène p24 du VIH
  ou l'ARN du VIH-1, l'antigène AgHBs; l'ADN du CMV n'est pas détecté par les méthodes PCR.
- ADN de lignée cellulaire humaine
- 0,1 % d'agent de conservation ProClin® 300

CMV L(+)C — 6 x 0,65 mL

(Témoin faiblement positif CMV)

- < 0,001 % phage lambda contenant de l'ADN du CMV à une concentration moyenne
  environ 100 fois inférieure à la concentration moyenne d'ADN du CMV dans le témoin CMV H(+)C
- Plasma humain, non réactif aux tests approuvés ou agréés par la FDA américaine
  pour les anticorps anti-VHC, les anticorps anti-VIH -1/2, l'antigène p24 du VIH
  ou l'ARN du VIH-1, l'antigène AgHBs; l'ADN du CMV n'est pas détecté par les méthodes PCR.
- ADN de lignée cellulaire humaine
- 0,1 % d'agent de conservation ProClin® 300

CMV (–) C — 6 x 0,65 mL

(Témoin négatif CMV)

- Plasma humain, non réactif aux tests approuvés ou agréés par la FDA américaine
  pour les anticorps anti-VHC, les anticorps anti-VIH 1/2, l'antigène p24 du VIH
  ou l'ARN du VIH-1, l'antigène AgHBs; l'ADN du CMV n'est pas détecté par les méthodes PCR.
- ADN de lignée cellulaire humaine
- 0,1 % d'agent de conservation ProClin® 300

CMV H(+)C Clip — 1 x 6 pinces
(Pince à code-barres du témoin fortement positif CMV)

CMV L(+)C Clip — 1 x 6 pinces
(Pince à code-barres du témoin faiblement positif CMV)

CMV (–) C Clip — 1 x 6 pinces
(Pince à code-barres du témoin négatif CMV)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent — PG WR — 1 x 5,1 L
Réactif de lavage COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N : 03587797 190)

PG WR
(Réactif de lavage COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)
Citrate de sodium dihydraté
< 0,1 % de N-méthylisothiazolone-HCl

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

A. DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO.

B. Ce test doit servir pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA.

C. Ne pas pipetter à la bouche.

D. Ne pas manger, boire ni fumer dans les zones de travail de laboratoire. Porter des gants de protection jetables, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Se laver soigneusement les mains après la manipulation des échantillons et des réactifs de test.

E. Éviter la contamination des réactifs par des microbes ou la nucléase lors du prélèvement d'aliquots dans les flacons de témoins.

F. Il est recommandé d'utiliser des pipettes stériles jetables et des embouts sans DNase.

G. Ne pas mélanger les témoins de lots différents ou de flacons différents d'un même lot.

H. Ne pas utiliser ensemble des cassettes de réactifs ou des témoins provenant de trousses différentes.

I. Ne pas ouvrir les cassettes COBAS® AmpliPrep, ni échanger, mélanger, retirer ou ajouter des flacons.

J. Jeter les réactifs non utilisés, les déchets et les échantillons conformément à la réglementation locale, provinciale, fédérale ou nationale.

K. Ne pas utiliser un nécessaire après sa date d'expiration.

L. Le bureau local de Roche peut, sur demande, fournir les fiches de sécurité des produits (SDS).

M. Les échantillons et les témoins doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux, conformément aux procédures de sécurité de laboratoire telles que celles décrites dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories[39] et le document du CLSI M29-A3.[40] Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les plans de travail à l'aide d'une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium fraîchement préparée avec de l'eau distillée ou déionisée.

Remarque : l'eau de Javel liquide vendue dans le commerce contient de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 5,25 %. Une dilution de l'eau de Javel selon un rapport de 1:10 donnera une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %.

N. AVERTISSEMENT : CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C contiennent du plasma humain dérivé du sang humain. Le produit d'origine a été soumis à des tests et s'est avéré ne pas réagir à la présence de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs), des anticorps anti-VIH-1 et VIH-2, des anticorps anti-VHC et de l'antigène p24 du VIH ou de l'ARN du VIH-1. Les tests PCR sur le plasma humain négatif n'indiquaient pas d'ADN du CMV détectable. Toutefois, aucune méthode de test connue ne peut garantir avec une certitude absolue que des produits dérivés du sang humain sont exempts de tout risque de transmission d'agents infectieux. C'est pourquoi tout produit d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infectieux. CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux, conformément aux procédures de sécurité de laboratoire telles que celles décrites dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories[39] et dans le document CLSI M29-A3.[40] Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les plans de travail à l'aide d'une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium fraîchement préparée avec de l'eau distillée ou déionisée.

O. MGP, EB, CMV QS, $MgCl_2$ et CMV MMX contiennent de l'azide de sodium. L'azoture de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre et former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination de solutions contenant de l'azide de sodium dans les éviers de laboratoire, rincer abondamment les évacuations afin d'éviter la formation de ces azides.

P. Porter des lunettes de protection, une blouse de laboratoire et des gants jetables lors de la manipulation de tout réactif. Éviter le contact de ces matériaux avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement à grande eau. Des brûlures peuvent apparaître en l'absence de traitement. En cas de déversement de ces réactifs, diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

Q. Ne pas laisser le CMV CS2 et les déchets liquides provenant de l'appareil COBAS® AmpliPrep, qui contiennent du thiocyanate de guanidine, entrer en contact avec la solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel). Ces mélanges peuvent générer un gaz très toxique.

R. Lors de l'élimination des unités de traitement d'échantillons usagées (SPU) COBAS® AmpliPrep contenant du thiocyanate de guanidine, éviter tout contact avec la solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel). Ces mélanges peuvent générer un gaz très toxique.

CONSERVATION ET MANIPULATION

A. Ne pas congeler les réactifs ou les témoins.

B. Conserver les réactifs CMV CS1, CMV CS2, CMV CS3 et CMV CS4 à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ces réactifs, non ouverts, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Après ouverture du flacon, ces réactifs restent stables pendant 70 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C ou jusqu'à la date de péremption, selon la première date limite atteinte. CMV CS1, CMV CS2, CMV CS3 et CMV CS4 peuvent être utilisés pendant 6 cycles d'appareil maximum et jusqu'à 100 heures cumulées sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. Les réactifs doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C entre les cycles de l'appareil.

C. Conserver CMV H(+)C, CMV L(+)C et CMV (–) C à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les témoins sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Une fois un flacon ouvert, toute partie inutilisée doit être éliminée.

D. Conserver les pinces à code-barres [CMV H(+)C Clip, CMV L(+)C Clip et CMV (–) C Clip] à une température comprise entre 2 et 30 °C.

E. Conserver le PG WR à une température comprise entre 2 et 30 °C. Le PG WR reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Après ouverture du flacon, ce réactif reste stable pendant 28 jours à une température comprise entre 2 et 30 °C ou jusqu'à la date de péremption, selon la première date limite atteinte.

MATÉRIEL FOURNI

A. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test
(P/N: 04902068 190)

CMVCAP

CMV CS1
(Cassettes de réactifs de particules de verre magnétiques CMV)

CMV CS2
(Cassette de réactifs de lyse CMV)

CMV CS3
(Cassette de réactifs multiples CMV)

CMV CS4
(Cassette de réactifs spécifiques au test CMV)

CMV H(+)C
(Témoin fortement positif)

CMV L(+)C
(Témoin faiblement positif)

CMV (–) C
(Témoin négatif CMV)

CMV H(+)C Clip
(Pince à code-barres du témoin fortement positif CMV)

CMV L(+)C Clip
(Pince à code-barres du témoin faiblement positif CMV)

CMV (–) C Clip
(Pince à code-barres du témoin négatif CMV)

B. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent
Réactif de lavage COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N: 03587797 190)

PG WR

PG WR
(Réactif de lavage COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Instruments et logiciel

- Appareil COBAS® AmpliPrep
- Analyseur COBAS® TaqMan® ou analyseur COBAS® TaqMan® 48
- En option : station d'accueil
- En option : appareil cobas p 630
- Logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4
- Unité de contrôle pour le logiciel AMPLILINK, avec imprimante

- Manuels de l'appareil et du logiciel :
  - Manuel d'utilisation de l'appareil COBAS® AmpliPrep à utiliser avec le logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4
  - Manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS® TaqMan® à utiliser avec le logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4
  - Manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 à utiliser avec le logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4
  - Manuel d'application du logiciel AMPLILINK version 3.3 à utiliser avec l'appareil COBAS® AmpliPrep, l'analyseur COBAS® TaqMan®, l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, l'analyseur COBAS® AMPLICOR et l'appareil cobas p 630

    ou
  - Manuel d'application du logiciel AMPLILINK, version 3.4
  - En option : manuel d'utilisation de l'appareil cobas p 630, version 2.2 du logiciel
- Fichier de définition de tests (FDT). Reportez-vous à la carte d'informations sur les produits incluse dans le kit pour obtenir le nom et la version actuelle du FDT.

Articles jetables

- Unités de traitement des échantillons : SPU
- Tubes d'échantillon d'entrée (tubes S) à pinces à code-barres
- Portoirs d'embouts K
- Portoirs de tubes K

AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Portoir d'échantillons (portoir SK 24)
- Portoir de réactifs
- Portoir SPU
- Porteur K
- Transporteur de porteur K
- Portoir de porteur K (devant être utilisé avec l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 uniquement)
- Pipetteurs (d'une capacité de 1 000 µL)* dotés d'embouts avec filtre de protection contre les aérosols ou à déplacement positif, exempts de DNase
- Gants jetables, non poudrés
- Mélangeur vortex

* Les pipetteurs doivent être précis à 3 % du volume indiqué. Des embouts sans DNase contre les aérosols ou à déplacement positif doivent être utilisés dans les cas indiqués pour empêcher la contamination croisée des échantillons et des amplicons.

PRÉLÈVEMENT, TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Remarque : manipuler tous les échantillons et tous les témoins comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux.

Remarque : ce test a été validé exclusivement pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA. L'analyse de types d'échantillons différents de ceux du type indiqué peut aboutir à des résultats inexacts.

A. Prélèvement des échantillons

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV doit être utilisé sur des échantillons de plasma. Le sang doit être prélevé dans des tubes stériles avec EDTA (bouchon de couleur lavande) comme anticoagulant et mélangé de façon adéquate, conformément aux instructions du fabricant des tubes.

B. Transport des échantillons

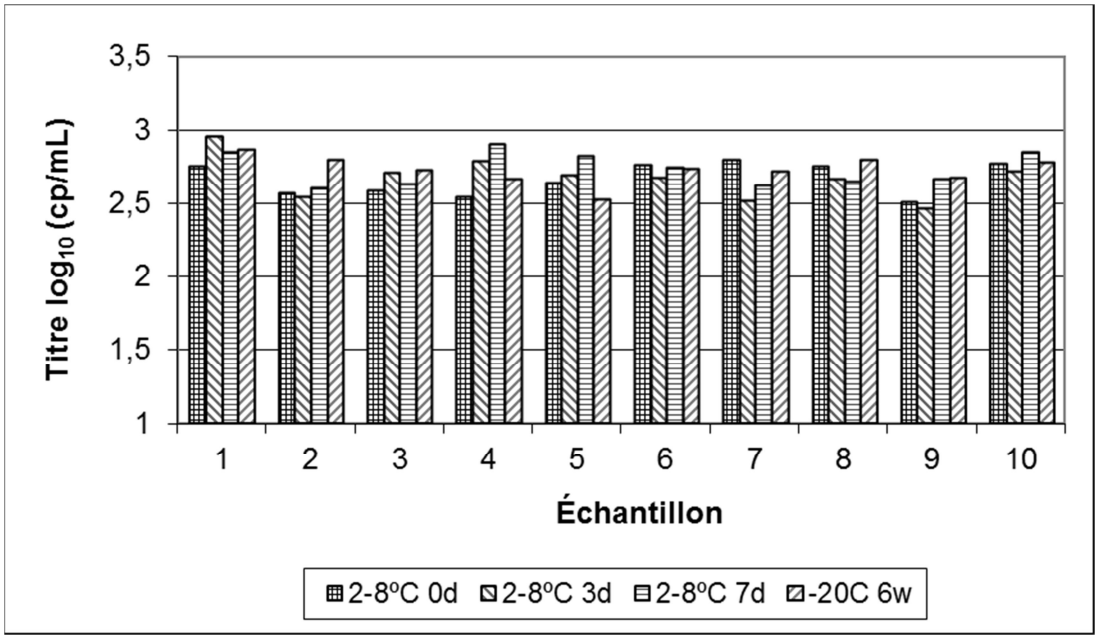
Conserver le sang total à une température comprise entre 2 et 25 °C pendant un maximum de 6 heures. Séparer le plasma du sang total dans les 6 heures suivant le prélèvement par centrifugation entre 800 et 1600 x g pendant 20 minutes, à température ambiante. Transférer le plasma dans un tube stérile en polypropylène.

Le transport des échantillons de sang total ou de plasma doit s'effectuer conformément à la réglementation locale, provinciale, fédérale et nationale pour le transport d'agents étiologiques.[41] Le sang total doit être transporté à une température comprise entre 2 et 25 °C et centrifugé dans les 6 heures suivant son prélèvement. Le plasma peut être transporté à une température comprise entre 2 et 8 °C ou congelé à une température $\leq$ –20 °C.

C. Conservation des échantillons

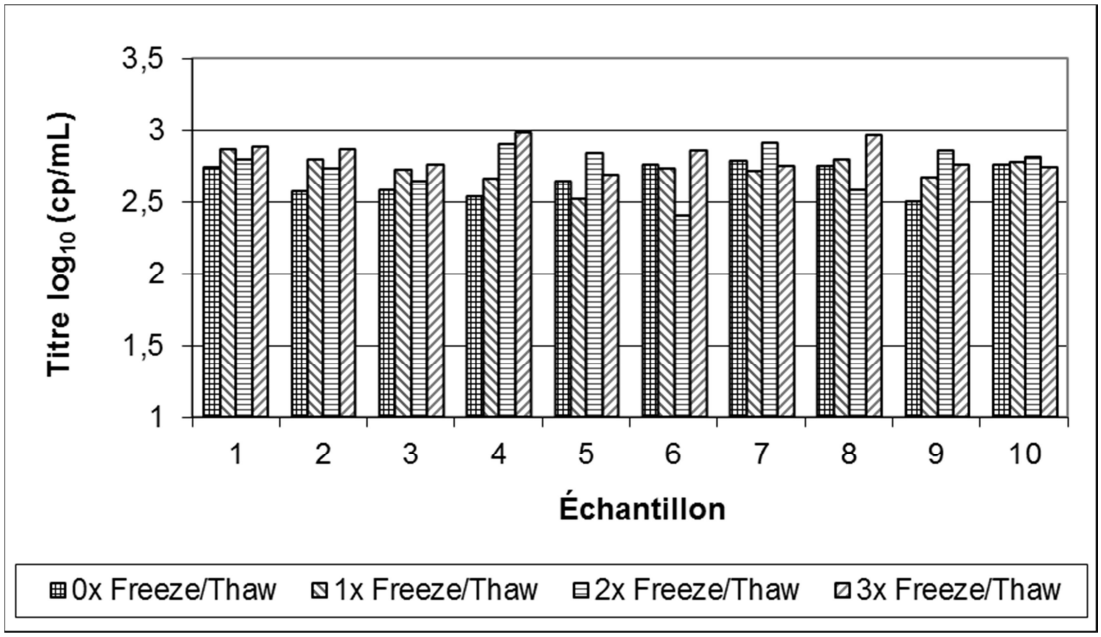
Les échantillons de plasma peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 7 jours maximum. Les échantillons de plasma restent stables pendant 6 semaines en étant congelés à une température $\leq$ –20 °C. Il est recommandé de conserver les échantillons sous forme d'aliquots de 550-600 µL dans des tubes de 2,0 mL stériles en polypropylène et à bouchon fileté (tels que les Sarstedt 72.694.006). La figure 4 montre les données d'études de stabilité des échantillons. Ces études de conservation des échantillons ont été effectuées avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Figure 4
Stabilité du CMV dans le plasma EDTA



Les échantillons de plasma peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 3 fois sans perte significative d'ADN du CMV. La figure 5 montre les données d'une étude de congélation/décongélation réalisée à l'aide du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Figure 5
Résultats du CMV après jusqu'à 3 cycles de congélation/décongélation (C-D) (plasma EDTA)



MODE D'EMPLOI

Remarque : pour obtenir des instructions d'utilisation détaillées, une description exhaustive des différentes configurations possibles, des instructions sur l'impression des résultats, l'interprétation des messages, commentaires et messages d'erreur, consulter : (1) le manuel d'utilisation de l'appareil COBAS® AmpliPrep à utiliser avec le logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4; (2) le manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS® TaqMan® à utiliser avec le logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4; (3) le manuel d'utilisation de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 à utiliser avec le logiciel AMPLILINK, versions 3.3 et 3.4; (4) le manuel d'application du logiciel AMPLILINK version 3.3 à utiliser avec l'appareil COBAS® AmpliPrep, l'analyseur COBAS® TaqMan®, l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, l'analyseur COBAS® AMPLICOR® et l'appareil cobas p 630 ou le manuel d'application du logiciel AMPLILINK, version 3.4; (5) En option : le manuel d'utilisation de l'appareil cobas p 630, version 2.2.

Taille de lot

Chaque trousse contient des réactifs en quantité suffisante pour 72 tests, qui peuvent être effectués en lots de 12 à 24 tests. Au moins un réplicat de chaque témoin CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C doit être inclus dans chaque lot (voir la section « Contrôle qualité »).

Procédure de travail

L'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 doit effectuer l'analyse dans les 120 minutes qui suivent la préparation des échantillons et des témoins.

Remarque : ne pas congeler ou conserver les échantillons et les témoins traités à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Préparation des échantillons et des témoins

Remarque : si des échantillons congelés sont utilisés, les mettre à température ambiante jusqu'à ce qu'ils soient complètement décongelés, puis les mélanger au vortex pendant 3 à 5 secondes avant de les utiliser. Les témoins doivent être retirés du stockage à 2-8 °C et mis à température ambiante avant utilisation.

Préparation de l'appareil COBAS® AmpliPrep

Partie A. Maintenance et préparation

A1. L'appareil COBAS® AmpliPrep est prêt à fonctionner en mode veille.

A2. Mettre l'unité de contrôle du logiciel AMPLILINK sous tension (ON). Préparer l'unité de contrôle de la façon suivante :

1. Ouvrir une session sur le système d'exploitation Microsoft Windows.
2. Cliquer deux fois sur l'icône du logiciel AMPLILINK.
3. Ouvrir une session dans le logiciel AMPLILINK en entrant l'ID utilisateur et le mot de passe attribués.

A3. Vérifier la quantité de réactif de lavage (PG WR) dans l'écran Status et le remplacer si nécessaire.

A4. Effectuer tout l'entretien décrit dans l'onglet Due. L'appareil COBAS® AmpliPrep amorce automatiquement le système.

Partie B. Chargement des cassettes de réactifs

Remarque : toutes les cassettes de réactifs doivent être sorties de leur lieu de conservation à 2-8 °C, chargées immédiatement sur l'appareil COBAS® AmpliPrep et mises à température ambiante sur l'appareil au moins 30 minutes avant le traitement du premier échantillon. Ne pas laisser les cassettes de réactifs atteindre la température ambiante hors de l'appareil, car il pourrait se former de la condensation sur les étiquettes à code-barres. Ne pas nettoyer la condensation qui pourrait apparaître sur les étiquettes à code-barres.

B1. Placer le CMV CS1 sur un portoir de réactifs. Placer les réactifs CMV CS2, CMV CS3 et CMV CS4 sur un portoir de réactifs séparé.

B2. Charger le portoir de réactifs contenant le CMV CS1 dans la position de portoir A de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

B3. Charger le portoir de réactifs contenant les réactifs CMV CS2, CMV CS3 et CMV CS4 dans les positions de portoir B, C, D ou E de l'appareil COBAS® AmpliPrep. Voir le tableau 1 pour des informations supplémentaires.

Partie C. Chargement des articles jetables

Remarque : déterminer le nombre nécessaire de cassettes de réactifs COBAS® AmpliPrep, d'unités de traitement d'échantillon (SPU), de tubes d'échantillon d'entrée (tubes S), d'embouts K et de tubes K. Une SPU, un tube S d'entrée, un embout K et un tube K sont nécessaires pour chaque échantillon ou chaque contrôle.

Il est possible d'utiliser des procédures de travail multiples de l'appareil COBAS® AmpliPrep avec l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48. Pour référence, voir le tableau 1. En fonction de la procédure de travail utilisée, charger le nombre approprié de portoirs de cassettes de réactifs, de portoirs d'échantillons avec des tubes S d'entrées, de portoirs SPU, de portoirs d'embouts K, de portoirs de tubes K et de porteurs K sur des portoirs de porteurs K aux positions respectives de portoir de l'appareil COBAS® AmpliPrep (voir le tableau 1 pour des informations supplémentaires).

C1. Placer les SPU sur le ou les portoirs SPU et charger ceux-ci aux positions de portoir J, K ou L de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

C2. En fonction de la procédure de travail utilisée, charger le nombre approprié de portoir(s) de tubes K complets aux positions de portoir M, N, O ou P de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

C3. Charger le nombre approprié de portoirs d'embouts K complets aux positions de portoir M, N, O ou P de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

C4. Pour la procédure de travail 3 avec l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, charger les porteurs K sur des portoirs de porteurs K aux positions de portoirs M, N, O ou P de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Tableau 1
Procédures de travail possibles pour l'utilisation de l'appareil COBAS® AmpliPrep avec l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48

Procédure de travail		Mode de transfert dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48	Portoirs, porteurs et articles jetables	Position sur l'appareil COBAS® AmpliPrep
1	Appareil COBAS® AmpliPrep plus station d'accueil plus analyseur COBAS® TaqMan®	Transfert automatique de porteur K	Tubes K dans portoirs de tubes K pleins	M – P
			Embouts K dans portoirs d'embouts K pleins	M – P
			Tubes S d'entrée contenant des échantillons et des témoins sur portoirs d'échantillons	F – H
			SPU dans portoirs SPU	J – L
			CS1 sur portoir de cassettes	A
			CS2, CS3, CS4 sur portoir de cassettes	B – E
2	Appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur COBAS® TaqMan®	Transfert manuel des tubes K via le(s) portoir(s) d'échantillons dans l'analyseur COBAS® TaqMan®	Tubes K dans portoirs de tubes K pleins	M – P
			Embouts K dans portoirs d'embouts K pleins	M – P
			Tubes S d'entrée contenant des échantillons et des témoins sur portoirs d'échantillons	F – H
			SPU dans portoirs SPU	J – L
			CS1 sur portoir de cassettes	A
			CS2, CS3, CS4 sur portoir de cassettes	B – E
			<u>Une fois le traitement des échantillons terminé</u> : Tubes K sur portoirs d'échantillons (prêts pour le transfert manuel)	F – H
3	Appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur(s) COBAS® TaqMan® 48	Transfert manuel des porteurs K via le(s) portoir(s) de porteur K dans l'analyseur COBAS® TaqMan® 48	Tubes K dans portoirs d'échantillons	F - H
			Embouts K dans portoirs d'embouts K pleins	M - P
			Tubes S d'entrée contenant des échantillons et des témoins sur portoirs d'échantillons	F - H
			SPU dans portoirs SPU	J - L
			CS1 sur portoir de cassettes	A
			CS2, CS3, CS4 sur portoir de cassettes	B - E
			Porteur K à code-barres vide sur portoir de porteurs K	M - P
			<u>Une fois le traitement des échantillons terminé</u> : Tubes K dans porteur K sur portoir de porteurs K	M – P

Partie D. Ordre et chargement des échantillons

Remarque : si vous utilisez l'appareil cobas p 630 pour la préparation d'échantillons, veuillez vous reporter au manuel d'utilisation de l'appareil cobas p 630.

D1. Préparer les portoirs d'échantillons de la façon suivante : fixer une pince à étiquette à code-barres sur chaque position de portoir d'échantillons où un échantillon (tube S) doit être placé. Fixer une des pinces à étiquette à code-barres spécifiques des témoins [CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C] sur chaque position de portoir d'échantillons où les témoins (tube S) doivent être placés. Le numéro de lot de témoin des pinces à étiquette à code-barres pour témoins doit être le même que celui figurant sur les flacons de contrôles de la trousse. Veiller à assigner le témoin correct à la position ayant la pince à code-barres de témoin correspondante. Installer un tube S d'entrée dans chaque position contenant une pince à étiquette à code-barres.

D2. À l'aide du logiciel AMPLILINK, créer des ordres d'échantillon pour chaque échantillon et témoin de l'onglet Sample de la fenêtre Orders. Sélectionner le fichier de test approprié et terminer en sauvegardant.

D3. Attribuer l'ordre des échantillons et des témoins à des positions de portoir d'échantillons dans l'onglet Sample Rack de la fenêtre Orders. Le numéro du portoir d'échantillons doit être celui du portoir préparé à l'étape D1.

D4. Imprimer le compte-rendu de Sample Rack Order à utiliser comme feuille de travail.

D5. Préparer les portoirs d'échantillons et de témoins dans la zone désignée pour l'ajout d'échantillons et de contrôles comme suit : passer au vortex chaque échantillon et témoin [CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C] pendant 3 à 5 secondes. Éviter la contamination des gants lors de la manipulation des échantillons et des témoins.

D6. Au moyen d'une micropipette avec embout à filtre (protection contre les aérosols) ou à déplacement positif sans DNase, ajouter 500 µL de chaque échantillon et de chaque témoin [CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C] dans le tube S d'entrée portant l'étiquette à code-barres appropriée. Éviter de transférer des particules et/ou des caillots fibrineux de l'échantillon d'origine vers le tube S d'entrée. Il convient de transférer les échantillons et les contrôles aux positions déterminées pour les tubes et enregistrées sur la feuille de travail à l'étape D4. Le numéro de lot de témoin des pinces à étiquette à code-barres pour témoins doit être le même que celui figurant sur les flacons de contrôles de la trousse. Assigner le témoin correct à la position ayant la pince à code-barres de témoin appropriée. Éviter de contaminer la partie supérieure des tubes S avec des échantillons ou des témoins.

D7. Pour les procédures de travail 1 et 2, charger le(s) portoir(s) contenant les tubes S d'entrée dans les positions de portoirs F, G ou H de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

D8. Pour la procédure de travail 3 utilisant l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, charger le(s) portoir(s) d'échantillons contenant les tubes S d'entrée et les tubes K (un par tube S d'entrée, chargé immédiatement à droite de celui-ci) aux positions de portoir F, G ou H de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Partie E. Démarrage d'une analyse sur l'appareil COBAS® AmpliPrep

E1. Démarrer l'appareil COBAS® AmpliPrep à l'aide du logiciel AMPLILINK.

Partie F. Fin d'une analyse sur l'appareil COBAS® AmpliPrep et transfert sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 (uniquement pour les procédures de travail 2 et 3)

F1. Vérifier la présence d'alertes ou de messages d'erreur.

F2. Retirer les échantillons et témoins traités de l'appareil COBAS® AmpliPrep soit sur des portoirs d'échantillons (pour l'analyseur COBAS® TaqMan® sans station d'amarrage), soit sur des portoirs de porteurs K (pour l'analyseur COBAS® TaqMan® 48) selon la procédure de travail (pour plus de détails, voir Partie G).

F3. Retirer les déchets de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Remarque : les échantillons et témoins traités ne doivent pas être exposés à la lumière après leur préparation.

Amplification et détection

Configuration de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou analyseur COBAS® TaqMan® 48

L'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 doit effectuer l'analyse dans les 120 minutes qui suivent la préparation des échantillons et des témoins.

Remarque : ne pas congeler ou conserver les échantillons et les témoins traités à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Partie G. Chargement des échantillons traités

G1. Effectuer les étapes appropriées à la procédure de travail pour transférer les tubes K dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 :

Procédure de travail 1 : Transfert automatique du portoir K via la station d'accueil dans l'analyseur COBAS® TaqMan®. Une intervention manuelle n'est pas nécessaire.

Procédure de travail 2 : Transfert manuel des tubes K dans le(s) portoir(s) d'échantillons vers l'analyseur COBAS® TaqMan®

Procédure de travail 3 : Transfert manuel des porteurs K sur le(s) portoir(s) de porteur K vers l'analyseur COBAS® TaqMan® 48. Transfert manuel de porteurs K dans l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 à l'aide du transporteur de porteur K.

Partie H. Démarrage d'une analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48

H1. Démarrer l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 par une des options présentées ci-dessous en fonction de la procédure de travail utilisée :

Procédure de travail 1 : Aucune intervention n'est nécessaire.

Procédure de travail 2 : Démarrage automatique de l'analyseur COBAS® TaqMan® après insertion des portoirs d'échantillons.

Procédure de travail 3 : Remplir le porteur K de tubes K vides s'il y a moins de 6 tubes K sur le porteur. Le remplissage est guidé par le logiciel AMPLILINK. Ouvrir le couvercle du thermocycleur, charger le porteur K dans le thermocycleur et fermer le couvercle. Démarrer l'analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48.

Partie I. Fin d'une analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48

I1. À la fin de l'analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, imprimer le compte-rendu des résultats obtenus. Vérifier la présence d'alertes ou de messages d'erreur dans le compte-rendu des résultats. Les échantillons accompagnés d'alertes et de commentaires doivent être interprétés comme décrit dans la section « Résultats ». Une fois qu'elles sont acceptées, archiver les données.

I2. Retirer les tubes K usagés de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48.

RÉSULTATS

L'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 détermine automatiquement la concentration d'ADN du CMV dans les échantillons et les témoins. La concentration en ADN du CMV est exprimée en copies (cp)/mL. Le facteur de conversion entre les copies d'ADN du CMV/mL (tel que défini par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV) et les unités internationales (UI)/mL est de 1,1 cp/UI [0,91 UI/cp] tel que défini dans la première norme internationale de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques pour le cytomégalovirus humain (NIBSC 09/162).[1] Ce facteur de conversion entre les « copies » et les « UI » peut être différent pour d'autres dosages de l'ADN du CMV.

Logiciel AMPLILINK :

- Détermine la valeur seuil du cycle (Ct) de l'ADN du CMV et de l'ADN du QS du CMV.
- Détermine la concentration en ADN du CMV en fonction des valeurs Ct pour l'ADN du CMV et l'ADN du QS du CMV et les coefficients d'étalonnage spécifiques des lots figurant sur les codes-barres des cassettes.
- Vérifie que les titres en cp/mL calculés pour CMV L(+)C et CMV H(+)C se situent dans les plages assignées.

Validation de lot – AMPLILINK versions 3.3 et 3.4

Consulter la fenêtre des résultats du logiciel AMPLILINK ou l'impression pour vérifier la présence de messages et de commentaires et s'assurer de la validité du lot. Pour les ordres de témoins, vérifier si la valeur en cp/mL du témoin se situe dans la plage assignée. Si la valeur cp/mL du témoin se situe hors de son domaine, un message d'alerte (FLAG) est généré indiquant que le témoin a échoué.

Le lot est valide si aucune alerte n'apparaît pour les témoins [CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C].

Le lot n'est pas valide si un des messages suivants apparaît dans les témoins CMV :

Témoin négatif

Message	Résultat	Interprétation
NC_INVALID	Invalid	Un résultat invalide ou un résultat « valide » qui n'était pas négatif pour la cible du CMV

Témoin faiblement positif CMV

Message	Résultat	Interprétation
LPCINVALID	Invalid	Résultat invalide ou témoin hors limites

Témoin fortement positif CMV

Message	Résultat	Interprétation
HPCINVALID	Invalid	Résultat invalide ou témoin hors limites

Si le lot est invalide, l'analyse doit être entièrement recommencée (préparation des échantillons et des contrôles, amplification et détection).

Interprétation des résultats

Si le lot est valide, vérifier la présence de messages ou de commentaires pour chaque échantillon sur les résultats imprimés. Interpréter les résultats comme suit :

- Un lot valide peut comprendre des résultats d'échantillons valides et non valides en fonction de la présence de messages et/ou de commentaires accompagnant les échantillons individuels.

Les résultats des échantillons s'interprètent comme suit :

	Résultats de titre	Interprétation
	Target Not Detected	Enregistrer les résultats comme suit : « ADN du CMV non détecté ».
Copies/mL	< 1.50E+02 cp/mL	Les cp/mL calculées se situent sous la limite de quantification de l'analyse. Enregistrer les résultats comme suit : « ADN du CMV détecté, moins de 150 cp/mL d'ADN du CMV ».
	≥ 1.50E+02 cp/mL et ≤ 1.00E+07 cp/mL	Les résultats calculés supérieurs ou égaux à 150 cp/mL d'ADN du CMV et inférieurs ou égaux à 1,00E+07 cp/mL d'ADN du CMV sont conformes au domaine de linéarité du test.
	> 1.00E+07 cp/mL	Les cp/mL calculées dépassent le domaine du test. Enregistrer les résultats comme suit : « supérieur à 1,00E+07 cp/mL d'ADN du CMV ». Si l'on désire obtenir des résultats quantitatifs, l'échantillon d'origine doit être dilué dans du plasma humain prélevé sur EDTA CMV négatif et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution.
Unités Internationales/mL	< 1.37E+02 IU/mL	Les UI/mL calculées se situent sous la limite de quantification de l'analyse. Enregistrer les résultats comme suit : « ADN du CMV détecté, moins de 137 UI/mL d'ADN du CMV ».
	≥ 1.37E+02 IU/mL et ≤ 9.10E+06 IU/mL	Les résultats calculés supérieurs ou égaux à 137 UI/mL d'ADN du CMV et inférieurs ou égaux à 9,10E+06 UI/mL d'ADN du CMV sont dans le domaine de linéarité du test.
	> 9.10E+06 IU/mL	Les UI/mL calculées dépassent le domaine du test. Enregistrer les résultats comme suit : « supérieur à 9,10E+06 UI/mL d'ADN du CMV ». Si l'on désire obtenir des résultats quantitatifs, l'échantillon d'origine doit être dilué dans du plasma humain prélevé sur EDTA CMV négatif et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution.

Remarque : les échantillons qui se trouvent au-dessus du domaine du test et qui produisent un résultat non valide accompagné d'un message « QS_INVALID » ne doivent pas être reportés comme étant > 9,10E+06 UI/mL ou > 1,00E+07 cp/mL. L'échantillon d'origine doit être dilué dans du plasma EDTA CMV négatif et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution.

Remarque : résultat de titre « Failed ». Interprétation : l'échantillon n'a pas été traité correctement.

Remarque : résultat de titre « Invalid ». Interprétation : résultat non valide.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un réplicat de chaque témoin négatif COBAS® TaqMan®, du témoin faiblement positif pour le CMV et du témoin fortement positif pour le CMV doit être inclus dans chaque lot d'analyse. Le lot est valide si aucune alerte n'apparaît pour les témoins [CMV (–) C, CMV L(+)C et CMV H(+)C].

Vérifier que les résultats imprimés ne contiennent ni message ni commentaire afin de s'assurer de la validité du lot.

Témoin négatif

Le CMV (–) C doit produire un résultat « Target Not Detected ». Si le CMV (–) C est accompagné d'un message d'alerte d'invalidité, alors la totalité du lot est invalide. Répéter tout le processus (préparation des échantillons et des contrôles, amplification et détection). Si les valeurs CMV (–) C sont toujours non valides sur plusieurs lots, contacter votre distributeur local Roche pour obtenir une assistance technique.

Témoins positifs

Le domaine théorique des réactifs CMV L(+)C et CMV H(+)C figure sur les codes-barres des cassettes de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. Le nombre de cp/mL d'ADN du CMV calculées pour le CMV L(+)C et le CMV H(+)C doit se situer dans le domaine théorique. Si l'un et/ou l'autre des deux témoins positifs ne satisfait pas à ces critères, le lot entier n'est pas valide. Répéter tout le processus (préparation des échantillons et des contrôles, amplification et détection).

Si le titre d'ADN du CMV de l'un et/ou l'autre des deux témoins positifs se situe nettement hors du domaine théorique pour plusieurs lots, contacter votre distributeur local Roche pour obtenir une assistance technique.

PRÉCAUTIONS RELATIVES À LA PROCÉDURE

Comme pour le déroulement de tout test, de bonnes pratiques de laboratoire sont indispensables pour assurer la qualité de cette analyse.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Ce test a été validé exclusivement pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA. L'analyse de types d'échantillons différents de ceux du type indiqué peut aboutir à des résultats inexacts.

2. Pour que les résultats obtenus soient fiables, les échantillons doivent avoir été prélevés, transportés, conservés et traités de façon appropriée.

3. La présence de l'enzyme AmpErase dans le mélange réactionnel du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV réduit le risque de contamination par les amplicons. Cependant, une contamination par des témoins ou par des échantillons cliniques CMV positifs ne peut être évitée que par de bonnes pratiques de laboratoire et un respect scrupuleux des consignes fournies dans cette notice d'utilisation.

4. L'utilisation de ce produit doit être limitée au personnel ayant reçu une formation sur les techniques de PCR.

5. Ce produit ne peut être utilisé qu'avec l'appareil COBAS® AmpliPrep et l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48.

6. Bien qu'il s'agisse d'un cas rare, des mutations au niveau des zones hautement conservées du génome viral couvertes par les amorces et/ou les sondes du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV pourraient entraîner une sous-estimation de la quantification du virus ou l'échec de la détection du virus.

7. La détection de l'ADN du CMV dépend du nombre de particules virales présentes dans l'échantillon et peut être influencée par les méthodes de collecte d'échantillons et les facteurs relatifs aux patients (p. ex., l'âge, la présence de symptômes ou le stade de l'infection).

8. En raison des différences inhérentes à chaque technologie, il est recommandé aux utilisateurs, avant de passer d'une technologie à l'autre, de mener des études de corrélation de méthodes au sein de leur laboratoire afin de quantifier les différences entre les diverses technologies.

9. Les seuils de décision clinique pour les valeurs de charge virale exprimées en unités internationales/mL (UI/mL) n'ont pas été fixés. Nous recommandons au personnel médical d'utiliser le facteur de conversion adapté pour passer des UI/mL aux copies/mL (cp/mL) avant de prendre des décisions cliniques utilisant des résultats donnés en UI/mL.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Des taux élevés de triglycérides (jusqu'à 3 300 mg/dL), de bilirubine conjuguée (jusqu'à 20 mg/dL), de bilirubine non conjuguée (jusqu'à 20 mg/dL), d'hémoglobine (jusqu'à 200 mg/dL) et d'ADN humain (jusqu'à 0,4 mg/dL) dans les échantillons de même que les maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (LES), l'arthrite rhumatoïde (AR) et les anticorps antinucléaires (ANA) n'ont pas présenté d'interférences avec la quantification de l'ADN du CMV et n'ont pas affecté la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. L'évaluation a été effectuée conformément à la directive CLSI EP7-A2[42] en utilisant un lot de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Les composés médicamenteux énumérés au tableau 2 ci-dessous ont été testés à 3 fois la concentration plasmatique maximale (Cmax) et n'ont pas perturbé la quantification de l'ADN du CMV ou affecté la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Tableau 2
Composés médicamenteux dont l'interférence a été testée

Immunodépresseurs	Antibactériens
Azathioprine	Sulfaméthoxazole
Cyclosporine	Triméthoprime
Mofétilmycophénolate	Céfotétan
Mycophénolate de sodium	Pipéracilline
Sirolimus	Tazobactam de sodium
Tacrolimus	Clavulanate de potassium
Évérolimus	Ticarcilline disodique
Prednisone	Vancomycine
Médicaments anti-CMV	**Antifongiques**
Ganciclovir	Fluconazole
Valganciclovir	
Cidofovir	
Foscarnet	

ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE NON CLINIQUE

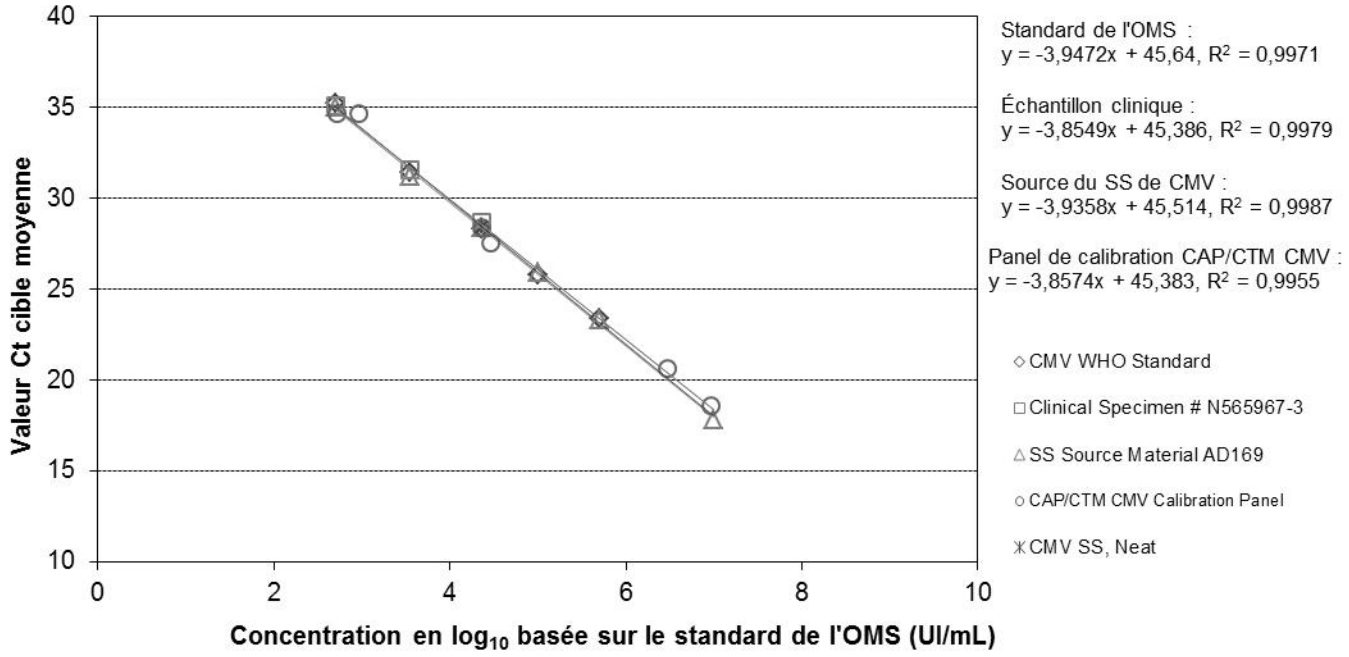
A. Traçabilité avec le premier standard international de l'OMS pour le cytomégalovirus humain

Plusieurs étalons et témoins ont été utilisés pendant le développement de ce test pour permettre une traçabilité avec la première norme internationale de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques pour le cytomégalovirus humain (NIBSC 09/162).[1]

Les standards utilisés pendant le développement de ce test comprennent le standard CMV de l'OMS, le standard secondaire CMV RMS, le produit d'origine du standard secondaire CMV RMS et le panel de calibration CMV RMS (Lambda CMA1.2). Les standards, le panel de calibration et un échantillon clinique de CMV indépendant ont été testés à des niveaux identiques. La plage de concentration testée pour le standard CMV de l'OMS s'étendait de 5,00E+02 UI/mL à 5,00E+05 UI/mL (2,70 – 5,70 $\log_{10}$ UI/mL), de 5,00E+02 UI/mL à 1,00E+07 UI/mL (2,70 – 7,00 $\log_{10}$ UI/mL) pour le produit d'origine du standard secondaire CMV RMS, de 5,23E+02 à 9,30E+06 UI/mL (2,72 – 6,97 $\log_{10}$ UI/mL) pour le panel de calibration CMV RMS et de 5,00E+02 UI/mL à 22 686 UI/mL (2,70 – 4,36 $\log_{10}$ UI/mL) pour l'échantillon clinique de CMV indépendant.

Tous les produits ont réagi de la même manière et ont présenté des résultats de dilution colinéaires dans le domaine de linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV (CAP/CTM CMV) (Figure 6).

Figure 6
Traçabilité du test COBAS® AmpliPrep/COBA® TaqMan® CMV
avec le premier standard international de l'OMS pour le cytomégalovirus humain



B. Limite de détection

La limite de détection du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV a été déterminée par l'analyse d'un échantillon positif à l'ADN CMV et du deuxième standard CMV RMS, dilués dans du plasma EDTA humain négatif au CMV. Les panels des 2 sources de CMV ont été séparés en 6 séries de dilution indépendantes de 6 unités de donneurs de plasma EDTA CMV négatif. La série de dilution des échantillons cliniques positifs à l'ADN CMV était constituée de 6 niveaux (43, 85, 127, 169, 255 et 339 UI/mL ou 47, 93, 140, 186, 280 et 373 cp/mL); la série de dilution du standard secondaire CMV RMS était constituée de 6 niveaux (46, 91, 137, 182, 273 et 364 UI/mL ou 50, 100, 150, 200, 300 et 400 cp/mL).

Un minimum de 208 réplicats par niveau de concentration a été testé après avoir combiné les réplicats des panels préparés à partir des échantillons positifs à l'ADN CMV et du deuxième standard CMV RMS. La limite de détection a été déterminée en utilisant 3 lots de réactifs et les 3 procédures de travail (appareil COBAS® AmpliPrep amarré à un analyseur COBAS® TaqMan®, appareil COBAS® AmpliPrep relié à un analyseur COBAS® TaqMan® et appareil COBAS® AmpliPrep relié à un analyseur COBAS® TaqMan® 48). L'évaluation a été effectuée conformément aux directives CLSI EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation (protocoles pour la détermination de la limite de détection et de la limite de quantification); Approved Guideline.[43]

La concentration en ADN du CMV pouvant être détectée avec un taux de positivité supérieur à 95 %, tel que déterminé par l'analyse PROBIT, est de 56 UI/mL (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 50 à 66 UI/mL) ou de 61 cp/mL (IC à 95 % : 55 à 72 cp/mL). Les résultats combinés pour les 3 lots de réactifs sont présentés au tableau 3.

Tableau 3
Limite de détection et analyse PROBIT du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV
en utilisant un échantillon et le deuxième standard CMV RMS

Entrée nominale (ADN du CMV, en UI/mL)		Entrée nominale (ADN du CMV, en cp/mL)		Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Taux de positivité
Deuxième standard CMV RMS	Échantillon clinique	Deuxième standard CMV RMS	Échantillon clinique			
364	339	400	373	208	208	100 %
273	255	300	280	210	210	100 %
182	169	200	186	209	209	100 %
137	127	150	140	210	210	100 %
91	85	100	93	210	209	99,50 %
46	43	50	47	210	188	89,50 %
0	0	0	0	210	0	0 %
Taux de succès de 95 % avec l'analyse PROBIT				56 UI/mL (IC à 95 % : 50 à 66 UI/mL) 61 cp/mL (IC à 95 % : 55 à 72 cp/mL)		

C. Précision

La précision du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV a été déterminée en analysant un panel de 8 membres, conformément à la directive CLSI EP5-A2.[44] Le panel a été préparé en utilisant un échantillon positif à l'ADN CMV pour l'extrémité inférieure du domaine de linéarité et, aucun échantillon ayant un titre très élevé n'étant disponible, en diluant du CMV en culture (souche AD169) pour la partie centrale et l'extrémité supérieure du domaine de linéarité. Les deux matériaux sources ont été dilués dans du plasma EDTA CMV négatif. Le panel de 8 membres couvrait une plage allant de 2,00E+02 cp/mL d'ADN du CMV à 1,00E+07 cp/mL d'ADN du CMV.

Chaque membre du panel a été analysé avec 2 réplicats par analyse, à raison de 2 analyses par jour, pendant au minimum 12 jours, et pour chacune des 2 procédures de travail (appareil COBAS® AmpliPrep amarré à un analyseur COBAS® TaqMan® et appareil COBAS® AmpliPrep relié à un analyseur COBAS® TaqMan® 48) pour un total de 96 réplicats par membre du panel, les réplicats étant distribués de façon uniforme sur 3 lots de kit, 4 systèmes COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® et au moins 2 opérateurs. Chaque échantillon a été soumis à toutes les étapes du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV (préparation de l'échantillon, amplification et détection). La précision indiquée plus bas prend donc en compte tous les aspects de la procédure de test. Les résultats pour chaque lot de réactifs et pour les 3 lots combinés de réactifs sont présentés au tableau 4.

Tableau 4
Précision du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV

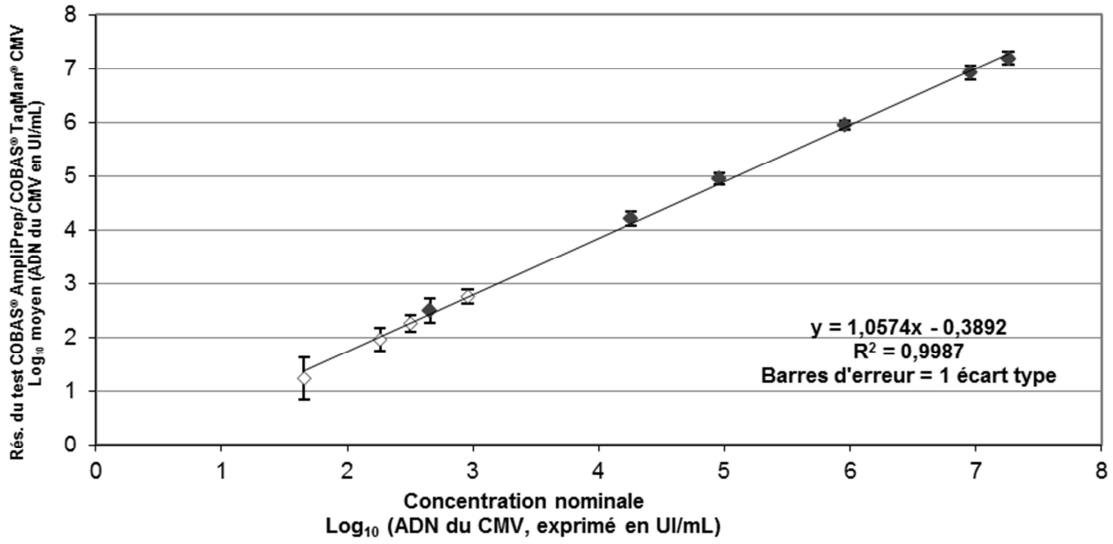
Titre (cp/mL)	Lot n° 1		Lot n° 2		Lot n° 3		Trois lots combinés		
	N	Écart-type total exprimé en log_{10}	N	Écart-type total exprimé en log_{10}	N	Écart-type total exprimé en log_{10}	N	Écart-type total exprimé en log_{10}	CV total en %
CMV en culture (souche AD169)									
1,00E+07	32	0,10	32	0,08	32	0,12	96	0,12	28 %
1,00E+06	32	0,10	32	0,05	32	0,07	96	0,09	20 %
1,00E+05	32	0,10	32	0,08	32	0,10	96	0,10	24 %
2,00E+04	32	0,14	32	0,15	32	0,08	96	0,13	30 %
5,00E+02	32	0,22	32	0,23	32	0,26	96	0,24	59 %
Échantillon									
1,00E+03	32	0,11	32	0,12	32	0,10	96	0,12	29 %
3,20E+02	32	0,17	32	0,16	32	0,13	96	0,16	39 %
2,00E+02	32	0,21	32	0,20	32	0,20	96	0,21	53 %

D. Domaine de linéarité

Le domaine de linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV a été déterminé en analysant un panel de 10 membres, conformément à la directive CLSI EP6-A.[45] Le panel a été préparé en utilisant un échantillon positif à l'ADN CMV pour l'extrémité inférieure du domaine de linéarité et, aucun échantillon ayant un titre très élevé n'étant disponible, en diluant du CMV en culture (souche AD169) pour la partie centrale et l'extrémité supérieure du domaine de linéarité. Les deux matériaux sources ont été dilués dans du plasma EDTA CMV négatif. Le panel composé de 10 membres a couvert une plage de 4,55E+01 UI/mL d'ADN de CMV à 1,82E+07 UI/mL d'ADN de CMV (5,0E+01 cp/mL d'ADN de CMV à 2,0E+07 cp/mL d'ADN de CMV). Chaque membre du panel a été analysé avec 2 réplicats par analyse, à raison de 2 analyses par jour, pendant au minimum 12 jours, et pour chacune des 2 procédures de travail (appareil COBAS® AmpliPrep amarré à un analyseur COBAS® TaqMan® et appareil COBAS® AmpliPrep relié à un analyseur COBAS® TaqMan® 48) pour un total de 96 réplicats par membre du panel, les réplicats étant distribués de façon uniforme sur 3 lots de kit, 4 systèmes COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®, et au moins 2 opérateurs. Chaque échantillon a été soumis à toutes les étapes du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV (préparation de l'échantillon, amplification et détection).

Comme le montre la figure 7, selon la directive CLSI EP6-A, le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV était linéaire de 4,55E+01 UI/mL d'ADN du CMV à 1,82E+07 UI/mL d'ADN du CMV (5,0E+01 cp/mL d'ADN du CMV à 2,0E+07 cp/mL d'ADN du CMV). Sur la base de la limite basse de quantification de 1,37E+02 UI/mL d'ADN du CMV (1,5E+02 cp/mL d'ADN du CMV), le domaine de linéarité s'étend de 1,37E+02 UI/mL d'ADN du CMV à 9,10E+06 UI/mL d'ADN du CMV (1,5E+02 cp/mL d'ADN du CMV à 1,0E+07 cp/mL d'ADN du CMV).

Figure 7
Linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV



Remarque : les symboles vides et pleins représentent les valeurs moyennes du titre $\log_{10}$ des dilutions d'un échantillon clinique et d'une culture de la souche AD169 du CMV, respectivement.

E. Performances du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV avec des échantillons négatifs en IgG anti-CMV

Les performances du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV ont été déterminées avec 2 lots de réactifs en analysant des échantillons de plasma EDTA négatifs en IgG anti-CMV provenant de receveurs d'une allogreffe rénale qui étaient Donneur (+) / Receveur (–) en sérologie CMV avant de recevoir le rein. Au total, 151 des 157 échantillons de plasma EDTA provenant de 156 patients ont donné des résultats négatifs pour l'ADN du CMV avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. Pour 6 résultats positifs à l'ADN du CMV, une analyse complémentaire d'échantillons prélevés longitudinalement sur les mêmes patients a montré que les patients avaient eu antérieurement ou ultérieurement une infection par le CMV. De plus, un test PCR indépendant sur le CMV a confirmé la présence d'ADN du CMV dans 5 des 6 résultats discordants. À la suite de l'analyse de la résolution, 151 des 152 échantillons séronégatifs en IgG du CMV ont donné un résultat négatif concernant la présence d'ADN du CMV, donnant ainsi un taux de spécificité de 99,3 % (IC à 95 % : 96,4 % à 100,0 %).

F. Spécificité analytique

La spécificité analytique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV a été évaluée en ajoutant des organismes de culture (virus, bactéries, levures) à une concentration d'entrée de 1,0E+06 particules/mL à du plasma EDTA humain négatif au CMV et à du plasma EDTA positif au CMV à 7,5E+02 cp/mL de CMV (voir le tableau 5).

Aucun des organismes testés n'a présenté d'interférence avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. Les échantillons CMV positifs ont présenté des résultats de titres à ± 0,3 $\log_{10}$ d'un témoin CMV positif.

Tableau 5
Échantillons de spécificité analytique

Virus de l'herpès humain	Autres virus
Virus de l'herpès simplex type 1	Polyomavirus BK
Virus de l'herpès simplex type 2	Polyomavirus JC
Virus varicelle-zona	Virus de l'hépatite A
Virus d'Epstein Barr	Virus de l'hépatite B
Herpèsvirus humain 6	Virus de l'hépatite C
Herpèsvirus humain 7	VIH de type 1
Herpèsvirus humain 8	Adénovirus, type 5
	Parvovirus B19
Bactéries	**Champignons**
Mycoplasma pneumoniae	Aspergillus niger
Propionibacterium acnes	Candida albicans
Salmonella typhimurium	Cryptococcus
Staphylococcus aureus	
Streptococcus pneumoniae	

G. Comparaison des méthodes du test COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR et du test LightCycler® CMV Quant

Les performances du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV ont été comparées à celles du test COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR en analysant 111 échantillons cliniques CMV positifs non dilués. Seules les paires de titres valides comprises dans les domaines de linéarité des deux analyses comparées ont été prises en compte pour l'analyse de régression linéaire (voir Figure 8).

Les performances du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV ont été comparées à celles du test LightCycler® CMV Quant en utilisant le système LightCycler® 480 et en analysant 90 échantillons cliniques CMV positifs non dilués. Seules les paires de titres valides comprises dans les domaines de linéarité des deux analyses comparées ont été prises en compte pour l'analyse de régression linéaire (voir Figure 9).

Figure 8
Corrélation entre le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV et le test COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR

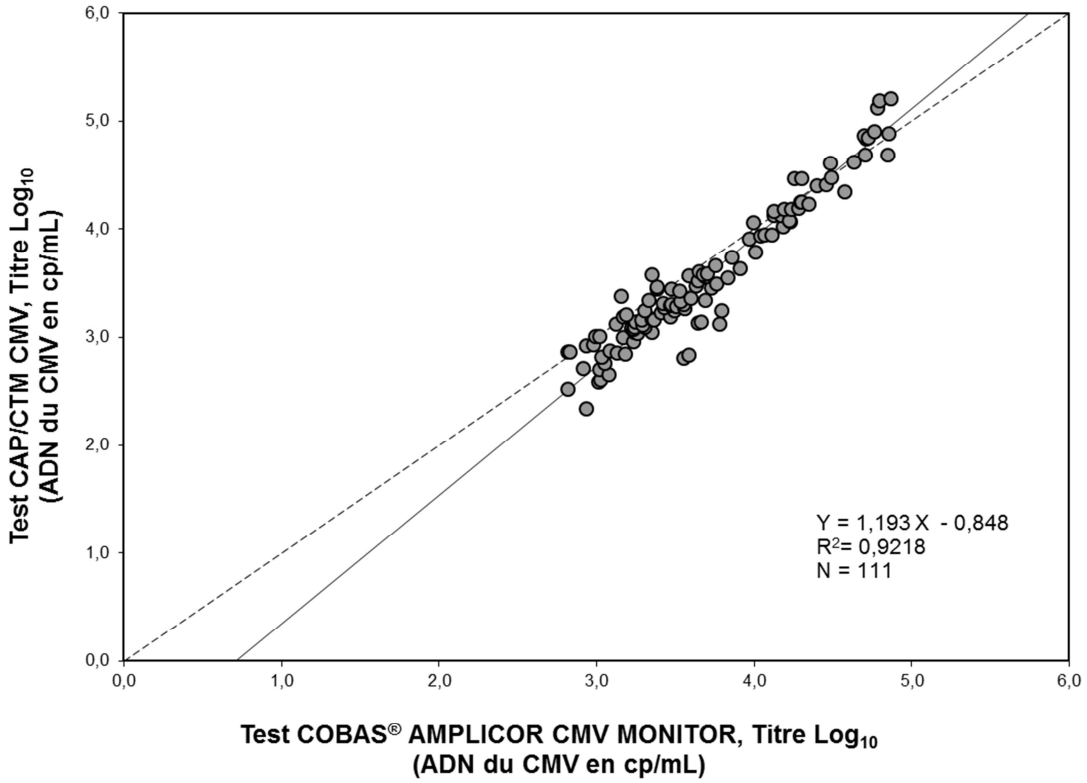
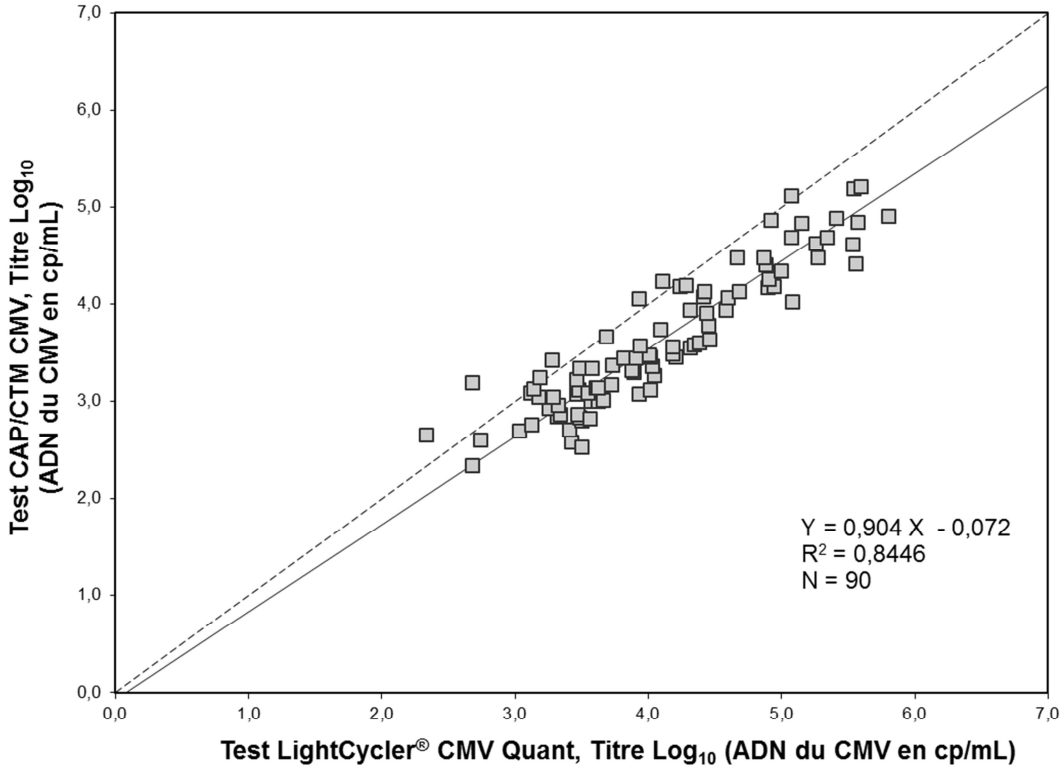


Figure 9
Corrélation entre le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV et le test LightCycler® CMV Quant



ÉVALUATION DES PERFORMANCES CLINIQUES

Utilité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV

Méthodes

Cette étude d'utilité clinique est une étude de cohortes longitudinale et rétrospective portant sur 211 receveurs de greffe de rein qui avaient reçu par le passé un diagnostic de maladie à CMV et qui prenaient des médicaments anti-CMV (ganciclovir ou valganciclovir). L'étude VICTOR, étude originale, était un essai clinique contrôlé et randomisé comparant l'efficacité d'un traitement anti-CMV administré par voie intraveineuse ou orale pendant 21 jours, suivi d'un traitement oral pendant 28 jours supplémentaires chez des receveurs de greffe d'organe solide chez qui on avant diagnostiqué une maladie à CMV.[46] Étant donné la nécessité de stratifier en fonction du type de greffe d'organe, cette étude s'est concentrée sur les receveurs de greffe de rein. Les échantillons conservés dont le volume était suffisant étaient analysés avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV à certains points dans le temps. La charge virale était analysée avec les données cliniques disponibles en fonction des objectifs de l'étude, en vérifiant les caractéristiques cliniques initiales pertinentes. La principale mesure du résultat clinique était le délai avant la résolution de la maladie à CMV, défini par le nombre de jours entre l'inscription à l'étude (départ) et la résolution clinique de la maladie à CMV. Des évaluations cliniques régulières de la maladie à CMV (résolution des symptômes de syndrome viral ou signes de lésions des organes cibles) avaient lieu aux jours 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35, 42 et 49 de l'étude. Les caractéristiques cliniques initiales pertinentes comprenaient les données démographiques, la manifestation de la maladie à CMV, le traitement attribué aléatoirement, les antécédents de traitement immunodépresseur et l'état sérologique du receveur pour CMV.

Pour le premier objectif, le délai avant la résolution de la maladie à CMV après l'instauration du traitement a été évalué à la recherche d'un lien avec les résultats initiaux de la charge virale. Le deuxième objectif consistait à déterminer l'utilité de la surveillance de la charge virale du CMV des patients par l'analyse du lien entre les variations de la charge virale et le délai avant la résolution de la maladie à CMV après l'instauration du traitement. Selon les données disponibles, on a observé une diminution de 1,5 $\log_{10}$ UI/mL de la virémie du CMV entre le début de l'étude et le jour 14[47]. De même, la suppression virologique à une valeur inférieure à la limite de quantification du test (y compris les résultats « Target Not Detected ») aux jours 7, 14 et 21 a été analysée à la recherche d'un lien avec le délai de résolution de la maladie à CMV[48,49]. En raison de l'obtention d'un résultat inférieure à la limite de détection avec tous les dosages, la suppression virale a été définie comme correspondant aux résultats < à la limite de quantification et aux résultats « Target Not Detected ».

On a utilisé des modèles multivariés des hasards proportionnels de Cox pour examiner le lien entre le délai de résolution de la maladie à CMV et les variables d'intérêt, avec un ajustement pour les covariables initiales pertinentes (âge, sexe, race/appartenance ethnique, état sérologique du receveur pour le CMV, antécédents de traitement anti-CMV, affectation aléatoire aux groupes ganciclovir ou valganciclovir et antécédents de schéma immunodépresseur). Les données étant incomplètes, l'état sérologique du donneur et le génotype gB du CMV n'ont pas été inclus dans les modèles.

Résultats

Au cours de l'étude d'utilité clinique, 100 % des cycles d'analyse (63 des 63 cycles d'analyse) étaient valides, 99 % (1 223/1 235) des résultats des tests étant valides. Les répartitions des caractéristiques démographiques étaient semblables chez les receveurs d'une greffe rénale de l'étude Victor et les participants évaluables de l'étude d'utilité clinique (tableau 6).

Tableau 6
Caractéristiques démographiques des receveurs d'une greffe rénale de l'étude VICTOR et des participants évaluables de l'étude d'utilité clinique

		Groupe des receveurs d'une greffe rénale de l'étude VICTOR (N=237)	Participants évaluables pour l'étude de l'utilité clinique		
			Type de maladie à CMV		Toutes les maladies à CMV (N=211)
			Syndrome de CMV (N=113)	Maladie à CMV avec invasion tissulaire (N=98)	
Sexe	Homme	149 (62,9)	75 (66,4)	54 (55,1)	129 (61,1)
	Femme	88 (37,1)	38 (33,6)	44 (44,9)	82 (38,9)
Catégorie d'âge	18-29	47 (19,8)	23 (20,4)	22 (22,4)	45 (21,3)
	30-39	52 (21,9)	27 (23,9)	21 (21,4)	48 (22,7)
	40-49	46 (19,4)	18 (15,9)	20 (20,4)	38 (18,0)
	50-59	56 (23,6)	26 (23,0)	26 (26,5)	52 (24,6)
	≥ 60	36 (15,2)	19 (16,8)	9 (9,2)	28 (13,3)
Race/ appartenance ethnique	Race blanche	172 (72,6)	91 (80,5)	60 (61,2)	151 (71,6)
	Race noire	8 (3,4)	3 (2,7)	2 (2,0)	5 (2,4)
	Asiatique	27 (11,4)	10 (8,8)	15 (15,3)	25 (11,8)
	Hispanique	18 (7,6)	3 (2,7)	15 (15,3)	18 (8,5)
	Autre	12 (5,1)	6 (5,3)	6 (6,1)	12 (5,7)
Région	Asie-Pacifique	77 (32,5)	50 (44,2)	21 (21,4)	71 (33,6)
	Europe	88 (37,1)	29 (25,7)	47 (48,0)	76 (36,0)
	Amérique du Nord	14 (5,9)	8 (7,1)	5 (5,1)	13 (6,2)
	Amérique du Sud	58 (24,5)	26 (23,0)	25 (25,5)	51 (24,2)

Remarque : les chiffres représentent des décomptes (avec les pourcentages) dans chaque colonne.

On observe des répartitions semblables des caractéristiques cliniques entre les receveurs de greffe rénale de l'étude VICTOR et les participants évaluables de l'étude d'utilité clinique au tableau 7.

Tableau 7
Caractéristiques cliniques des receveurs d'une greffe rénale de l'étude VICTOR
et des participants évaluables de l'étude d'utilité clinique

		Groupe des receveurs d'une greffe rénale de l'étude VICTOR (N = 237)	Participants évaluables pour l'étude de l'utilité clinique		
			Type de maladie à CMV		Toutes les maladies à CMV (N=211)
			Syndrome de CMV (N=113)	Maladie à CMV avec invasion tissulaire (N=98)	
État sérologique du donneur d'organe(D)/ du receveur (R) pour le CMV	Manquant	70 (29,5)	39 (34,5)	23 (23,5)	62 (29,4)
	D-/R-	13 (5,5)	5 (4,4)	6 (6,1)	11 (5,2)
	D-/R+	16 (6,8)	7 (6,2)	8 (8,2)	15 (7,1)
	D+/R-	37 (15,6)	11 (9,7)	24 (24,5)	35 (16,6)
	D+/R+	101 (42,6)	51 (45,1)	37 (37,8)	88 (41,7)
État sérologique du receveur (R) pour le CMV	Manquant	5 (2,1)	3 (2,7)	1 (1,0)	4 (1,9)
	R+	172 (72,6)	93 (82,3)	59 (60,2)	152 (72,0)
	R-	60 (25,3)	17 (15,0)	38 (38,8)	55 (26,1)
Stratégie anti-CMV antérieure	Prophylactique	80 (33,8)	50 (44,2)	25 (25,5)	75 (35,5)
	Préemptive	1 (0,4)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,5)
	Traitement de la maladie	25 (10,5)	4 (3,5)	15 (15,3)	19 (9,0)
	Aucun	136 (57,4)	58 (51,3)	62 (63,3)	120 (56,9)
Traitement anti-CMV antérieur	Acyclovir	43 (18,1)	33 (29,2)	7 (7,1)	40 (19,0)
	Ganciclovir	47 (19,8)	19 (16,8)	22 (22,4)	41 (19,4)
	Valacyclovir	4 (1,7)	3 (2,7)	1 (1,0)	4 (1,9)
	Valganciclovir	33 (13,9)	12 (10,6)	17 (17,3)	29 (13,7)
	Aucun	136 (57,4)	58 (51,3)	62 (63,3)	120 (56,9)
Traitement assigné aléatoirement	Ganciclovir	115 (48,5)	61 (54,0)	43 (43,9)	104 (49,3)
	Valganciclovir	122 (51,5)	52 (46,0)	55 (56,1)	107 (50,7)
Sous-catégorie de maladie à CMV[a]	Syndrome de CMV	124 (52,3)	113 (100,0)	0 (0,0)	113 (53,6)
	CMV-IT : CMV–GI	19 (8,0)	0 (0,0)	18 (18,4)	18 (8,5)
	CMV-IT : hépatite	7 (3,0)	0 (0,0)	7 (7,1)	7 (3,3)
	CMV-IT : néphrite	80 (33,8)	0 (0,0)	70 (71,4)	70 (33,2)
	CMV-IT : pneumonie	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	CMV-IT : rétinite	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Autre CMV-IT	4 (1,7)	0 (0,0)	3 (3,1)	3 (1,4)
	Aucun CMV dans le sang	3 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Remarque : les chiffres représentent des décomptes (avec les pourcentages) dans chaque colonne.

[a] CMV GI = CMV avec œsophagite, gastroentérite ou colite; CMV-IT = maladie à CMV avec invasion tissulaire; Absence de CMV dans le sang = Absence de CMV dans le sang (au dépistage/au départ).

Tableau 7 (suite)
Caractéristiques cliniques des receveurs d'une greffe rénale de l'étude VICTOR
et des participants évaluables de l'étude d'utilité clinique

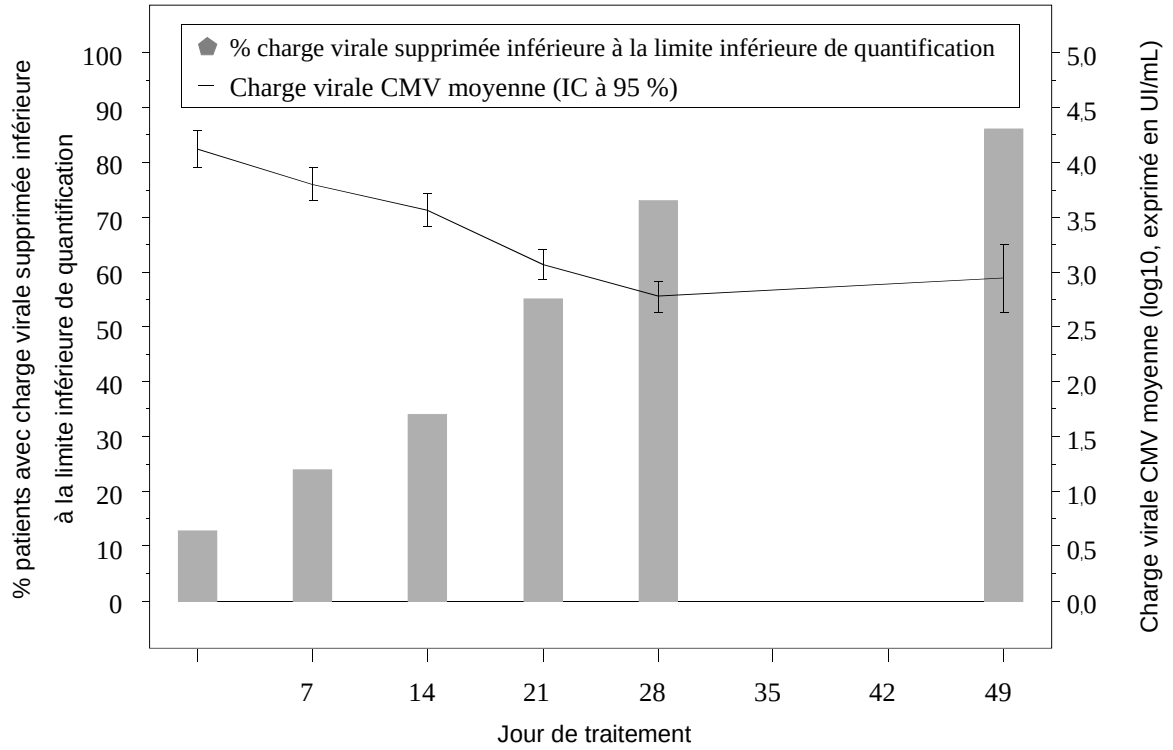
		Groupe des receveurs d'une greffe rénale de l'étude VICTOR (N=237)	Participants évaluables pour l'étude de l'utilité clinique		
			Type de maladie à CMV		Toutes les maladies à CMV (N=211)
			Syndrome de CMV (N=113)	Maladie à CMV avec invasion tissulaire (N=98)	
Traitement immuno-suppresseur antérieur	ATG	26 (11,0)	13 (11,5)	9 (9,2)	22 (10,4)
	Azathioprine	25 (10,5)	12 (10,6)	9 (9,2)	21 (10,0)
	Basiliximab	17 (7,2)	4 (3,5)	9 (9,2)	13 (6,2)
	Cyclosporine A	128 (54,0)	68 (60,2)	45 (45,9)	113 (53,6)
	Daclizumab	10 (4,2)	4 (3,5)	6 (6,1)	10 (4,7)
	Méthylprednisolone	68 (28,7)	29 (25,7)	29 (29,6)	58 (27,5)
	Mofétilmycophénolate	173 (73,0)	80 (70,8)	73 (74,5)	153 (72,5)
	OKT 3	1 (0,4)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,5)
	Prednisolone	85 (35,9)	45 (39,8)	28 (28,6)	73 (34,6)
	Prednisone	109 (46,0)	51 (45,1)	50 (51,0)	101 (47,9)
	Sirolimus	20 (8,4)	7 (6,2)	10 (10,2)	17 (8,1)
	Tacrolimus	75 (31,6)	35 (31,0)	35 (35,7)	70 (33,2)
	Autre	18 (7,6)	13 (11,5)	4 (4,1)	17 (8,1)
	Non indiqué	11 (4,6)	6 (5,3)	4 (4,1)	10 (4,7)
Génotype du CMV	Non établi*	103 (43,5)	51 (45,1)	36 (36,7)	87 (41,2)
	Génotype 1	43 (18,1)	16 (14,2)	25 (25,5)	41 (19,4)
	Génotype 2	30 (12,7)	16 (14,2)	12 (12,2)	28 (13,3)
	Génotype 3	30 (12,7)	16 (14,2)	10 (10,2)	26 (12,3)
	Génotype 4	13 (5,5)	3 (2,7)	8 (8,2)	11 (5,2)
	Infection mixte	18 (7,6)	11 (9,7)	7 (7,1)	18 (8,5)
Résistant – UL54	Non établi*	52 (21,9)	18 (15,9)	23 (23,5)	41 (19,4)
	Oui	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Non	185 (78,1)	95 (84,1)	75 (76,5)	170 (80,6)
Résistant – UL97	Non établi*	52 (21,9)	18 (15,9)	23 (23,5)	41 (19,4)
	Oui	1 (0,4)	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,5)
	Non	184 (77,6)	95 (84,1)	74 (75,5)	169 (80,1)

Remarque : les chiffres représentent des décomptes (pourcentages) dans chaque colonne.

* « Non établi » en raison d'un faible volume d'échantillon ou d'une faible charge virale

La figure 10 montre une comparaison de la charge virale du CMV moyenne (avec IC à 95 %) (log_{10} UI/mL) et le pourcentage de participants dont la charge virale du CMV réduite était < à la limite de quantification (y compris les résultats non décelables) en fonction du nombre de jours de traitement. Le pourcentage de participants de l'étude ayant une suppression virale < à la limite de quantification augmentait avec le nombre de jours de traitement. La charge virale moyenne du CMV diminuait généralement avec le nombre de jours de traitement entre le début de l'étude et le jour 49 chez les participants qui continuaient d'avoir des charges virales quantifiables.

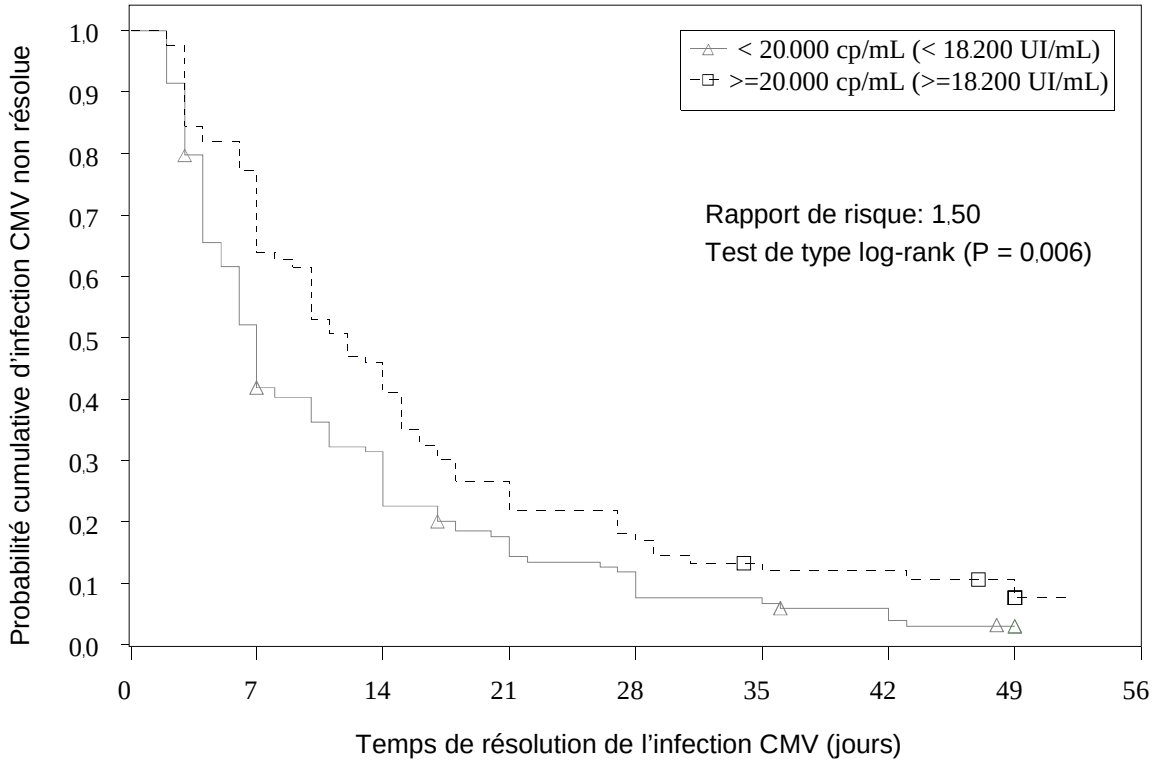
Figure 10
Comparaison de la suppression virale du CMV et de la charge virale moyenne du CMV en fonction du nombre de jours de traitement



Charge virale initiale et résolution clinique de la maladie à CMV (objectif 1)

La figure 11 montre une courbe de survie de Kaplan-Meier pour le délai (jours) avant la résolution de la maladie à CMV stratifié en fonction de la charge virale initiale du CMV (< 20 000 cp/mL, ≥ 20 000 cp/mL; ou < 18 200 UI/mL, ≥ 18 200 UI/mL). Il y a une nette séparation entre les courbes de survie, avec des délais plus courts de résolution de la maladie à CMV chez les participants ayant une charge virale initiale du CMV < 20 000 cp/mL (rapport des risques [RR] non ajusté = 1,50; test Mantel-Haenzel, P = 0,006).

Figure 11
Courbe de survie de Kaplan-Meier du délai de résolution de la maladie à CMV
en fonction du résultat initial du test CAP/CTM CMV
(< 20 000 cp/mL, ≥ 20 000 cp/mL [< 18 200 UI/mL, ≥ 18 200 UI/mL])



Résultat initial du test CAP/CTM CMV	Nombre de participants	N[bre] résolus (%)	N[bre] censurés (%)	Délai médian de résolution en jours (IC à 95 %)	Rapport des risques (RR)
< 20 000 cp/mL (< 18 200 UI/mL)	128	121 (94,5)	7 (5,5)	7,0 (6,0; 8,0)	1,50
≥ 20 000 cp/mL (≥ 18 200 UI/mL)	83	76 (91,6)	7 (8,4)	12,0 (10,0; 15,0)	
Total	211	197	14		

Le tableau 8 montre le modèle multivarié des hasards proportionnels de Cox pour la relation entre le délai de résolution de la maladie à CMV et la charge virale initiale du CMV. Le RR pour la charge virale initiale du CMV était de 1,46 (IC à 95 % = 1,08 à 1,99; P = 0,015), ce qui indique une probabilité 46 % supérieure de résolution de la maladie à CMV à tout point dans le temps chez les participants ayant une charge virale initiale du CMV < 20 000 cp/mL (< 18 200 UI/mL) comparativement à ceux dont la charge virale initiale du CMV était ≥ 20 000 cp/mL (≥ 18 200 UI/mL), après ajustement pour les covariables initiales pertinentes.

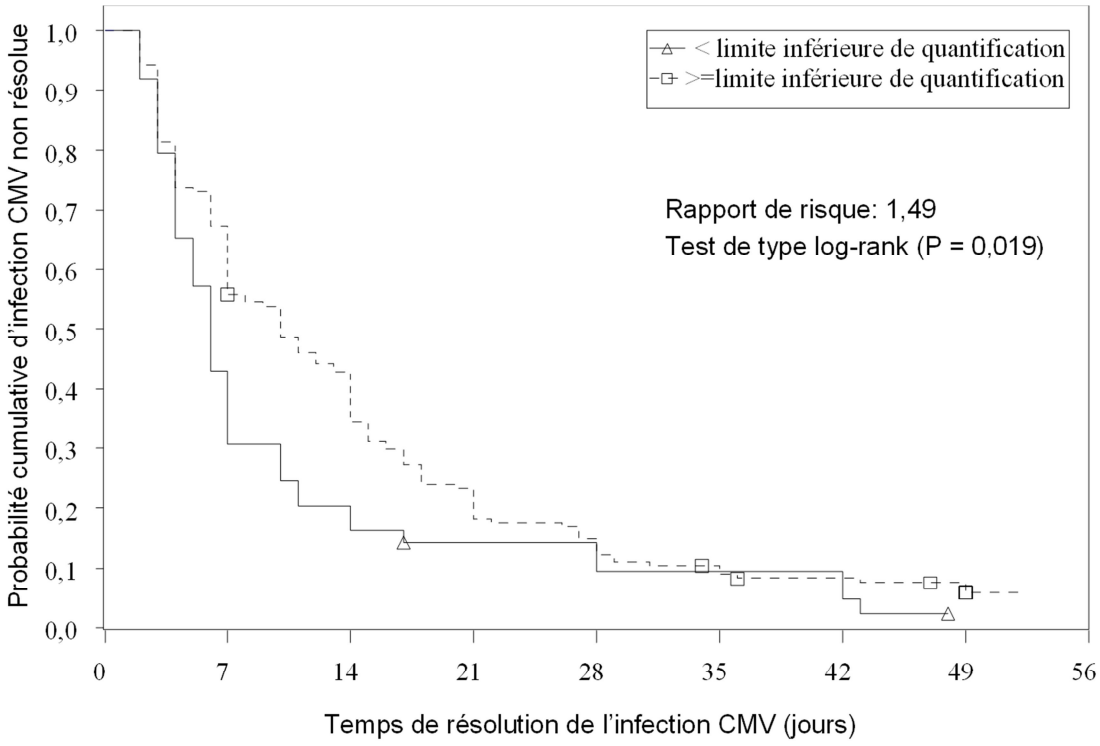
Diminution de la charge virale au jour 14 et résolution clinique de la maladie à CMV (objectif 2)

À l'analyse de la diminution de 1,5 $\log_{10}$ UI/mL de la charge virale entre le début de l'étude et le jour 14, on a calculé un rapport des risques non ajusté de 0,90 (test Mante-Haenzel P = 0,460). Ce résultat n'a pas changé dans l'analyse multivariée avec un ajustement pour les covariables initiales (tableau 8), ce qui indique qu'une diminution de la charge virale supérieure à 1,5 $\log_{10}$ UI/mL n'était pas associée au délai de résolution de la maladie à CMV. D'autres degrés de diminution de la charge virale (≥ 1,0, ≥ 2,0 et ≥ 2,5 $\log_{10}$ UI/mL) ont été évalués (données non montrées) et ne se sont pas non plus révélés prédictifs du délai de résolution de la maladie à CMV.

Suppression de la charge virale aux jours 7, 14 et 21 (< limite de quantification) et résolution clinique de la maladie à CMV (objectif 2)

La courbe de survie de Kaplan-Meier pour le délai de résolution de la maladie à CMV stratifié en fonction de la suppression virale < limite de quantification au jour 7 montre un large écart entre les courbes de survie des jours 4 à 27 (Figure 12). Le RR non ajusté pour l'association entre la suppression virale au jour 7 et le délai de résolution de la maladie à CMV était de 1,49 (test Mantel-Haenzel P = 0,019).

Figure 12
Courbe de survie de Kaplan-Meier pour le délai de résolution de la maladie à CMV
en fonction de la suppression de la charge virale en cours de traitement < à la limite de quantification au jour 7

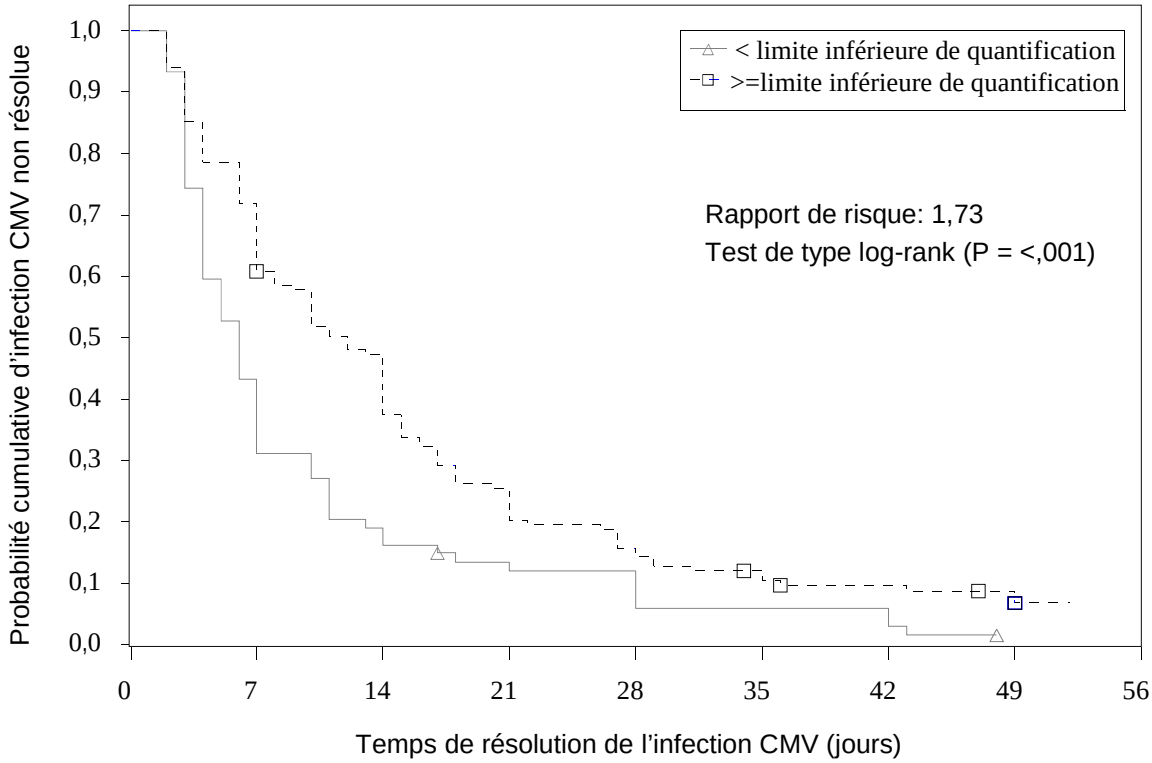


Suppression virale au jour 7	Nombre de participants	N[bre] résolus (%)	N[bre] censurés (%)	Délai médian de résolution en jours (IC à 95 %)	Rapport des risques (RR)
< limite de quantification	49	47 (95,9)	2 (4,1)	6,0 (5,0; 7,0)	1,49
≥ limite de quantification	156	145 (92,9)	11 (7,1)	10,0 (7,0; 14,0)	
Total	205	192	13		

Après ajustement pour les covariables initiales pertinentes, le RR pour la suppression virale au jour 7 était de 1,62 (IC à 95 % = 1,12 à 2,35; P = 0,010) à partir du modèle multivarié des hasards proportionnels de Cox (tableau 8). Ce résultat indique que la résolution de la maladie à CMV est plus rapide chez les receveurs d'une greffe rénale atteints de maladie à CMV qui reçoivent un traitement anti-CMV et dont la charge virale est réduite au jour 7.

Des délais plus courts de résolution de la maladie à CMV ont été observés chez les participants ayant une suppression virale < à la limite de quantification au jour 14 (Figure 13). Le test Mantel-Haenzel révèle une forte signification statistique entre les courbes de survie (P < 0,001).

Figure 13
Courbe de survie de Kaplan-Meier pour le délai de résolution de la maladie à CMV
en fonction de la suppression de la charge virale en cours de traitement < à la limite de quantification au jour 14

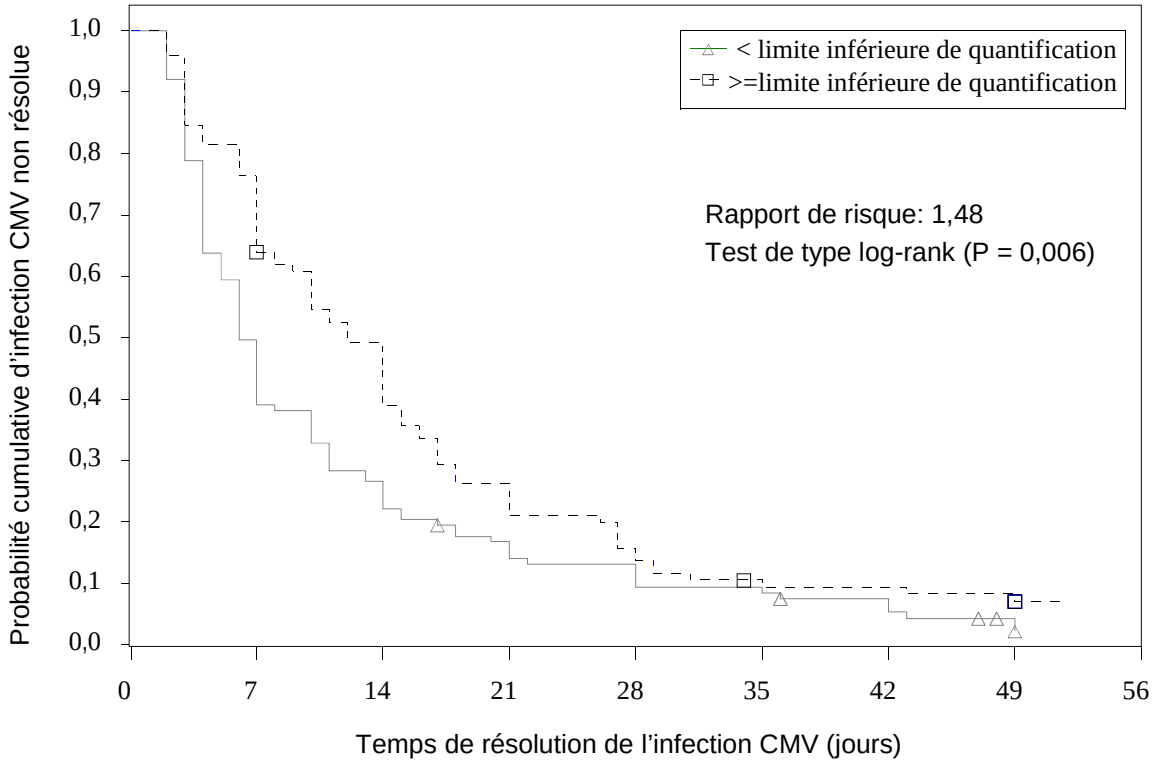


Suppression virale au jour 14	Nombre de participants	N[bre] résolus (%)	N[bre] censurés (%)	Délai médian de résolution en jours (IC à 95 %)	Rapport des risques (RR)
< limite de quantification	74	72 (97,3)	2 (2,7)	6,0 (4,0; 7,0)	1,73
≥ limite de quantification	135	124 (91,9)	11 (8,1)	12,0 (8,0; 14,0)	
Total	209	196	13		

Le modèle multivarié des hasards proportionnels de Cox pour le délai de résolution de la maladie à CMV et la suppression virale < à la limite de quantification au jour 14 est présenté au tableau 8. Le RR de 1,83 (IC à 95 % = 1,33 à 2,51; P < 0,001), indique qu'il y a 83 % plus de chance de résolution de la maladie à CMV à tout point dans le temps chez les participants ayant une suppression virale < à la limite de quantification au jour 14 que chez ceux qui ont une suppression virale ≥ à la limite de quantification au jour 14, après ajustement pour les covariables initiales pertinentes.

La courbe de survie de Kaplan-Meier pour le délai de résolution de la maladie à CMV stratifié pour les participants qui présentaient ou non une suppression virale < à la limite de quantification au jour 21 (Figure 14) montre aussi une séparation nette entre les courbes de survie (P = 0,006).

Figure 14
Courbe de survie de Kaplan-Meier pour le délai de résolution de la maladie à CMV
en fonction de la suppression de la charge virale en cours de traitement < à la limite de quantification au jour 21



Suppression virale au jour 21	Nombre de participants	N[bre] résolus (%)	N[bre] censurés (%)	Délai médian de résolution (IC à 95 %)	Rapport des risques (RR)
< limite de quantification	113	108 (95,6)	5 (4,4)	6,0 (5,0; 7,0)	1,48
≥ limite de quantification	97	89 (91,8)	8 (8,2)	12,0 (10,0; 14,0)	
Total	210	197	13		

Au tableau 8, le RR pour la suppression virale < à la limite de quantification au jour 21 est de 1,44 (P = 0,015), ce qui indique qu'il y a 44 % plus de chance de résolution de la maladie à tout point dans le temps chez les participants ayant une suppression virale < à la limite de quantification au jour 21 que chez ceux dont la suppression virale est ≥ à la limite de quantification au jour 21, après ajustement pour les variables initiales pertinentes.

Résumé des objectifs

Le tableau 8 résume les résultats des modèles multivariés des hasards proportionnels de Cox pour le lien entre les variables d'intérêt relatives à la charge virale (initiale, diminution de 1,5 $\log_{10}$ au jour 14 et suppression aux jours 7, 14 et 21) et le délai de résolution de la maladie à CMV. Les modèles multivariés étaient ajustés en fonction de l'âge, du sexe, de la race/appartenance ethnique, de l'état sérologique du receveur pour le CMV, des antécédents de traitement anti-CMV, de l'affectation aléatoire au groupe ganciclovir ou valganciclovir et du schéma immunosuppresseur antérieur (données non montrées). En raison des réductions dans la population de l'analyse, les modèles ne comprenaient pas les variables suivantes : état sérologique du donneur pour le CMV, génotype de la glycoprotéine B et résistance médicamenteuse.

Tableau 8
Rapports des risques ajustés pour les variables d'intérêt basées sur la charge virale
dans le modèle multivarié des hasards proportionnels de Cox pour le délai de résolution de la maladie à CMV,
ajusté en fonction des variables initiales pertinentes

			Rapport des risques ajustés[a]		
Variables d'intérêt basées sur la charge virale	Catégorie de charge virale	N	Estimation	IC 95 %	Valeur p
Résultat initial du test CAP/CTM CMV	< 18 200 UI/mL	207	1,46	(1,08; 1,99)	0,015
	≥ 18 200 UI/mL		(1,00)		
Diminution de la charge virale en cours de traitement au jour 14	≥ 1,5 $\log_{10}$ UI/mL	205	0,93	(0,68; 1,26)	0,633
	< 1,5 $\log_{10}$ UI/mL		(1,00)		
Suppression virale au jour 7	< limite de quantification	201	1,62	(1,12; 2,35)	0,010
	≥ limite de quantification		(1,00)		
Suppression virale au jour 14	< limite de quantification	205	1,83	(1,33; 2,51)	< 0,001
	≥ limite de quantification		(1,00)		
Suppression virale au jour 21	< limite de quantification	206	1,44	(1,07; 1,92)	0,015
	≥ limite de quantification		(1,00)		

Remarque : IC = intervalle de confiance. Remarque : les rangées avec des estimations du rapport des risques entre parenthèses indiquent des catégories de référence.

[a] Ajusté en fonction de l'âge (continu), du sexe, de la race/appartenance ethnique, du traitement affecté aléatoirement, de l'état sérologique du receveur (R) pour le CMV, des antécédents de traitement anti-CMV et du schéma immunosuppresseur antérieur (cyclosporine A, inhibiteurs des lymphocytes T ou corticostéroïdes).

Discussion

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV offre une valeur clinique pour les tests initiaux et le suivi thérapeutique des patients atteints de maladie à CMV qui reçoivent un traitement par des médicaments anti-CMV (ganciclovir ou valganciclovir). Il serait utile que les cliniciens qui assurent le suivi de tels patients sachent que les patients ayant une charge virale initiale du CMV < 18 200 UI/mL (20 000 copies/mL) sont susceptibles de guérir de la maladie à CMV plus rapidement que ceux qui ont une charge virale plus élevée au départ. Une diminution de la charge virale de 1,5 $\log_{10}$ au jour 14 du traitement n'est pas suffisante pour surveiller la réponse au traitement; toutefois, une suppression de la charge virale aux jours 7, 14 et 21 est en corrélation étroite avec la résolution de la maladie à CMV. Les patients dont la virémie du CMV n'est pas supprimée à ces points dans le temps ont vraisemblablement besoin d'une surveillance clinique plus étroite pour la prise en charge de la maladie à CMV et de ses séquelles.

CONCLUSION

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV a un large domaine de linéarité et est très spécifique et sensible. C'est le premier test commercial de dépistage du CMV à être normalisé selon le standard international de l'OMS pour la quantification du CMV et il démontre une grande exactitude relativement au standard dans tout son domaine de linéarité. Il affiche une robustesse à l'interférence et à la diversité virale et a une grande reproductibilité selon de multiples facteurs. Ces attributs analytiques complètent les résultats de l'étude d'utilité clinique et démontrent que le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV offre de l'information pertinente sur le plan médical pour les tests initiaux et le suivi thérapeutique des patients immunodéprimés atteints de maladie à CMV.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the collaborative study group. 2010 Collaborative Study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.

2. Griffiths PD. 2000. Cytomegalovirus. In Principles and Practice of Clinical Virology. eds. Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E. and Pattison, J.R. John Wiley and Sons, London. 79-116.

3. Pass R.F. 2001. Cytomegalovirus. In: Fields Virology. eds. Knipe, D., Howley, P. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2675-2706.

4. Kapranos N., Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. 2003. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. Fertility and Sterility 79:48-52.

5. Forbes BA. 1989. Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. Clinical Microbiological Reviews 2:204-216.

6. Numazaki, K. 1997. Human cytomegalovirus infection of breast milk. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 18:2:91-98.

7. Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP. 1998. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. Pediatric Infectious Disease Journal. 17:55-53.

8. Souza IE, Nicholson D, Matthey S, et al. 1994. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by polymerase chain reaction and a nonradioactive probe. Diagnostic Microbiology Infectious Disease 20:13-19.

9. Alford CA, Brill WJ. 1990. Cytomegalovirus. In: Virology, Vol. 2, 2nd ed., eds. Fields, B.N. Knipe, D.M. Raven Press, New York, NY. 1981-2010.

10. Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Ohshiro M, et al. 2003. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. Pediatrics. 111:1333-6.

11. Jordan MC. 1983. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. Reviews in Infectious Diseases 5:205-215.

12. Drew WL. 1989. Other virus infections in AIDS: I: Cytomegalovirus. Immunology and Serology 44:507-534.

13. Drew WL. 1992. Nonpulmonary manifestations of Cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. Clinical Microbiology Review 5:204-210.

14. Mocarski ES, Courcelle CT. 2001. Cytomegaloviruses and their replication. In: Fields Virology. eds. Knipe D and Howley P. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2629-2674.

15. Fedorko DP, Yan SS. 2002. Recent advances in laboratory diagnosis of human Cytomegalovirus infection. Clinical and Immunological Reviews 2:155-167.

16. Schafer P, Tenschert W, Gutensohn K, Laufs R. Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay. Journal of Clinical Microbiology 1997 35: 741-744.

17. Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, et al. 1997. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. AIDS 11:889-893.

18. Gor D, Sabin C, Prentice HG, et al. 1998. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. Bone Marrow Transplantation 21:597-605.

19. Hassan-Walker AF, Kidd IM, Sabin C, et al. 1999. Quantity of human cytomegalovirus (CMV) DNAemia as a risk factor for CMV disease in renal allograft recipients: Relationship with donor/recipient CMV serostatus, receipt of augmented methyl-prednisolone and antithymocyte globulin (ATG). Journal of Medical Virology 58:182-187.

20. Sanchez JL, Kruger RM, Paranjothi S, et al. 2001. Relationship of cytomegalovirus viral load in blood to pneumonitis in lung transplant recipients. Transplantation 2001 72:733-735.

21. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD, Covington E, Alecock E; Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. Am J Transplant. 2005 May; 5(5):1065-701

22. Griffiths P, Whitley R, Snydman DR, Singh N, Boeckh M; International Herpes Management Forum. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. Herpes. 2008 Oct; 15(1):4-12.

23. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snydman DR, Allen U, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. Transplantation. 2010 Apr 15; 89(7):779-95.

24. Marenzi, R., Cinque, P., Ceresa, D., et. al. 1996. Serum polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA for monitoring ganciclovir treatment in AIDS patients. Scandanavian Journal of Infectious Disease 28:347-351.

25. Rasmussen, L., Zipeto, D., Wolitz, R.A., et al. 1997. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNAburden in blood. Journal of Infectious Disease 176:1146-1155.

26. Shinkai M, Bozzette SA, Powderly W, et al. 1997. Utility of urine and leucocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. Journal of Infectious Disease 175:3029308.

27. Spector SA, Wong R, Hsia K, et al. 1998. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. Journal of Clinical Investigation 101:497-502.

28. Cope AV, Sweny P, Sabin C, et al. 1997. Quantity of cytomegalovirus viruria is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation. Journal of Medical Virology 52:200-205.

29. Gor D, Sabin C, Prentice HG, et al. 1998. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. Bone Marrow Transplantation 21:579-605.

30. Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., et al. 1991. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. Lancet 338:1170-1172.

31. Bowen EF, Wilson P, Cope A. et al. 1996. Cytomegalovirus retinitis in AIDS patients: influence of cytomegaloviral load on response to ganciclovir, time to recurrence and survival. AIDS 10:1515-1520.

32. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, Landini MP, Faldella G. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. Pediatrics. 2006 Jan; 117(1):e76-83.

33. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. Clin Transplant. 2008 Mar-Apr; 22(2):162-170.

34. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P, Styczynski J, Ward K; European Conference on Infections in Leukemia. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. Bone Marrow Transplant. 2008 Aug; 42(4):227-240.

35. Smith ES, Li AK, Wang AM, Gelfand DH, Myers TM. 2003. Amplification of RNA: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 211-219.

36. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 93:125-128.

37. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y). 10:413-417.

38. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research 6:986-994.

39. Richmond JY, McKinney RW. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.

41. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.

42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference Testing in Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Document EP7 A2. CSLI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. CLSI Document EP17-A [ISBN 1-56238-551-8]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

44. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP5 A2. CSLI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

45. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI Document EP6-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

46. Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, et al. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. Am J Transplant 2007; 7(9):2106-13.

47. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. J Infect Dis 2002; 186(6):829-33.

48. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. Transplantation 1999; 68(9):1305-11.

49. Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. J Infect Dis 2000; 181(2):717-20.

Information sur les révisions apportées au document	
Doc. Rev. 3.0 05/2015	Suppression des symboles de danger et des mentions et codes d'avertissement de la section RÉACTIFS. Ajout du symbole GTIN et de la description à la page des symboles harmonisée. La section « Marques commerciales et brevets » a été mise à jour de manière à référencer les ressources en ligne uniquement. Veuillez communiquer avec le représentant de Roche de votre région si vous avez d'autres questions.
Doc Rev. 4.0 07/2015	Mise à jour des versions, des manuels, de la terminologie et du système d'exploitation d'AMPLILINK. Veuillez communiquer avec le représentant de Roche de votre région si vous avez d'autres questions.

Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA

Distributed by

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877-273-3433)

Marques commerciales et brevets

Voir http://www.roche-diagnostics.us/patents

©2015 Roche Molecular Systems, Inc.

07/2015
Doc Rev. 4.0

06749143001-04

Les symboles suivants sont désormais en usage pour l'étiquetage des produits diagnostiques par PCR de Roche.

Logiciel auxiliaire

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Mandataire dans la Communauté européenne

Limite inférieure de l'écart prédéfini

Fiche de données à code-barres

Fabriquant

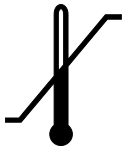
Code du lot

Conserver à l'abri de la lumière

Risques biologiques

Suffisant pour <n> tests

Référence du catalogue



Limites de température

Consulter les instructions d'utilisation

Fichier de définition de tests

Contenu de la trousse

Limite supérieure de l'écart prédéfini

Distribué par

Utiliser jusque

Uniquement pour l'évaluation des performances DIV

Code article international

Ce produit répond aux exigences de la Directive Européenne 98/79 CE concernant les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.